

PCT/DE03/03994
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



Rec'd PCT/PTO

31 MAY 2005

REC'D 28 APR 2004

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

BEST AVAILABLE COPY

Aktenzeichen: 102 56 900.2

Anmeldetag: 29. November 2002

Anmelder/Inhaber: Nemod Immuntherapie AG, 13125 Berlin/DE

Bezeichnung: Tumorspezifische Erkennungsmoleküle

IPC: C 07 K, C 12 N, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 17. März 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Stanechus

Tumorspezifische Erkennungsmoleküle

5

Die Erfindung betrifft Erkennungsmoleküle, die gegen Tumore gerichtet sind und zur Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen verwendet werden können.

Tumor- oder Krebserkrankungen sind Geschwulsterkrankungen, die eine örtlich umschriebene Zunahme des Gewebevolumens beschreiben. Im weiteren Sinne ist jede lokalisierte Anschwellung durch Ödeme, akute und/oder chronische Entzündungen, eine aneurysmatische Erweiterung oder auch eine entzündlich bedingte Organschwellung ein Tumor. Im engeren Sinne werden vor allem gewebliche Neubildungen wie Gewächse, Blastome und/oder Neoplasien in Form eines spontanen, verschiedenartig enthemmten, autonomen und irreversiblen Überschußwachstums von körpereigenem Gewebe, das in der Regel mit unterschiedlich ausgeprägtem Verlust spezifischer Zellen und Gewebefunktionen verbunden ist, als Tumorerkrankungen verstanden. Es ist möglich, Tumore nach ihrem biologischen Verhalten, aber auch nach einer histogenetischen Systematik bzw. nach klinischen oder pathologischen Befunden zu systematisieren.

Insbesondere im klinischen Bereich kann es erforderlich sein, Tumore möglichst frühzeitig und auch selektiv zu erkennen, da eine frühzeitige Erkennung und die dann folgende Behandlung bzw. Entfernung sicherstellt, daß die Geschwulst erfolgreich behandelt werden kann, ohne daß die befallenen Organstrukturen bzw. Genabschnitte deformiert werden, wobei weiterhin verhindert werden kann, daß sich Metastasen ausbilden. Auch

bei den Folgeuntersuchungen nach einer Krebsbehandlung müssen kleinste Metastasen frühzeitig detektiert werden, um die weitere Nachbehandlung zu optimieren. Für weite Bereiche der Arbeitsmedizin ist es außerdem notwendig, zu bestimmen, ob ein Gewebe oder ein Organ eine potentielle Krebsanfälligkeit zeigt, ohne daß das Organ bzw. das Gewebe bereits selbst entartet bzw. transformiert ist.

Die älteste und zugleich einfachste und zum Teil auch noch heute mit Erfolg angewendete Methode, einen Tumor zu erkennen, ist das Tasten und Schauen. So ist z.B. das Mammakarzinom bzw. das Prostatakarzinom als Knoten ertastbar. Hinweise auf Hautkrebs sind durch auffällige Muttermale durch den Arzt oder den Patienten selbst optisch zu detektieren. Andere optische Verfahren sind beispielsweise die bildgebenden Methoden. Hier werden mit Hilfe von Apparaten Bilder vom Körper aufgenommen, auf denen ein Tumor erkennbar ist. Zu diesen Methoden zählen zum Beispiel Röntgenbestrahlung wie auch die Computer-Tomographie (CT). Bei diesen Verfahren wird der Körper mit energiereicher Strahlung durchleuchtet, wobei die entarteten Gewebestrukturen aufgrund der veränderten Durchlässigkeit für diese Strahlung im Vergleich zum gesunden Gewebe erkennbar sind. Häufig werden bei diesen Methoden Kontrastmittel verwendet, die in entsprechende Regionen gespritzt werden und die Absorption erhöhen. Außerdem ist die Krebsdiagnose mittels Ultraschall sowie durch die Verwendung radioaktiv markierter Antikörper möglich, wobei die tumortypischen Antigene an die zu untersuchenden Organe binden und so die Tumore innerhalb des bildgebenden Verfahrens erkennbar machen. Neben den bildgebenden Methoden sind Laboruntersuchungen ein weiteres wichtiges Mittel zur Krebsfrüherkennung. Dabei werden Proben von Urin, Blut oder auch Gewebeproben auf Abnormitäten untersucht. Dies kann beispielsweise eine veränderte Zusammensetzung dieser Proben sein, aber auch das Auftreten von Substanzen, die normalerweise nicht oder nur in geringen

Mengen vorkommen. Diese Substanzen werden allgemein als Tumormarker bezeichnet. Sie werden entweder vom Tumorgewebe selbst produziert oder als Reaktion des Körpers auf den Tumor gebildet. Als Tumormarker werden neben Substanzen auch zelluläre Veränderungen bezeichnet, deren qualitative oder quantitative Analyse eine Aussage über das Vorliegen, den Verlauf oder eine Prognose von bösartigen Erkrankungen ermöglicht. Tumormarker sind meist physiologisch vorkommende bzw. modifizierte Substanzen, die gegenüber physiologischen Bedingungen oder der normalen genotypischen/phänotypischen Ausprägung im Urin, Serum oder anderen Körperflüssigkeiten in erhöhter oder erniedrigter Konzentration oder in oder auf Tumorzellen nachweisbar sind, wobei diese Substanzen vom Tumorgewebe synthetisiert und/oder sezerniert und folgend durch Tumorzerfall freigesetzt oder als Reaktion des Organismus auf einen Tumor gebildet werden. Es ist eine Vielzahl von Tumormarkern beschrieben worden, deren Einsatz insbesondere beim Dickdarmkrebs, Brustkrebs, Eierstockkrebs, Prostata- und Hodenkrebs und beim kleinzelligen Lungenkarzinom als sinnvoll gilt. Zu diesen Krebsmarkern gehört beispielsweise das CEA, CA 15-3, CA 125, Alpha-Fetoprotein, HCG, das prostataspezifische Antigen, die neuronspezifische Enolase, CA 19-9 und SCC.

Die genannten Marker zeigen durch eine Erhöhung im Serum oder in Geweben oder durch ihr Vorhandensein als modifizierte Proteine, Lipide und/oder Kohlenhydrate zum einen beispielsweise (i) entzündliche Erkrankungen, Darmpolypen, Virusentzündungen aber insbesondere auch (ii) Zirrrosen, Entartungen, Tumore und Metastasen an. Ein Großteil dieser Marker besteht aus Molekülen, die Protein- als auch Kohlenhydratstrukturen, ggf. Lipide umfassen. Je geringer der Proteinanteil und demgemäß je größer der Kohlenhydrat- oder Lipidanteil dieser Marker ist, um so schwieriger können diese beispielsweise mit Erkennungsmolekülen, wie z.B. Antikörpern,

detektiert werden. Bisher wurden durch Immunisierung von Mäusen mit Hilfe der Hybridom-Technologie verschiedene Antikörper gegen Kohlenhydratstrukturen hergestellt.

5 Die Krebsdiagnostik mit Erkennungsmolekülen weist mehrere Nachteile auf. So können bestimmte Tumormarker auch bei nichtkanzerogenen Krankheiten auftreten, wodurch die eingesetzten Erkennungsmoleküle eine positive Reaktion anzeigen; weiterhin bedeutet eine Nichtinteraktion der
10 Erkennungsmoleküle nicht, daß keine Tumorkrankheit vorhanden ist. Ein weiterer Nachteil ist, daß die bekannten Erkennungssubstanzen in der Regel unspezifisch sind. Das bedeutet, daß ein positiver Nachweis nur in seltenen Fällen auf eine bestimmte Art der Tumorerkrankung weist. Ein
15 weiterer, ganz entscheidender Nachteil der bekannten Erkennungsmoleküle ist außerdem, daß sie nur bedingt zur Verlaufskontrolle der Entwicklung von Tumoren, beispielsweise nach einer Operation, verwendet werden können. Das heißt, die bekannten Tumormarker können in der Regel nicht zur
20 Früherkennung oder zur Nachbehandlung, insbesondere nicht zur Prophylaxe eingesetzt werden.

Neben diesen allgemeinen Nachteilen treten bei Erkennungsmolekülen, die gegen Kohlenhydratstrukturen
25 gerichtet sind, spezielle Nachteile auf. Die Immunisierung mit Kohlenhydratantigenen führt meist nur zu einer primären IgM-Antwort bzw. die Immunantwort bleibt vollständig aus, da viele Kohlenhydratstrukturen auch Autoantigene sind. Weil Kohlenhydrate T-Cell-unabhängige Antigene sind, die nicht in
30 der Lage sind, einen Klassenswitch und die damit verbundene Reifung durch somatische Mutationen hervorzurufen, bleibt die Antikörperantwort meist auf die IgM-Klasse beschränkt. Aufgrund der generell schwachen Wechselwirkung und der notwendigen Multivalenz ist es deshalb schwierig, Antikörper
35 mit hoher Affinität herzustellen. Ein Problem bei Antikörpern

gegen Kohlenhydratstrukturen sind nicht nur die geringe Affinität, sondern auch die Spezifität. Besonders gegen kurze nichtgeladene Kohlenhydratstrukturen ist es äußerst schwierig, spezifische Antikörper herzustellen, wobei eine gewisse Spezifität in vielen Fällen auch nur dann erreicht wird, wenn die Kohlenhydratstruktur auf einem bestimmten Träger lokalisiert ist. So erkennt beispielsweise der Antikörper JAA/F11, der gegen $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \text{GalNAc}$ gerichtet ist, nicht nur dieses Antigen selbst, sondern auch $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 -$
10 $(\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6) \text{GalNAc}$ sowie, wenn auch mit geringerer Avidität, $\text{Gal}\beta 1 - 3 \text{GlcNAc}$. Auch die neueren Möglichkeiten der Gewinnung von Erkennungsmolekülen durch verschiedene Formen der kombinatorischen Techniken, wie beispielsweise der Phagendisplay-Technologie, lösen die genannten Nachteile
15 nicht. Auch hier bleibt das Problem der schwachen Erkennungsmolekül-Kohlenhydrat-Interaktion. Zu berücksichtigen ist hierbei insbesondere, daß die durch Immunisierung meistgewonnenen primären IgM-Antikörper für den therapeutischen Einsatz zu groß sind. Ein weiterer Nachteil
20 der bekannten Erkennungsmoleküle gegen Tumormarker ist der, dass sie den Tumor erst erkennbar machen, wenn dieser eine kritische Größe bereits erreicht hat. Das heißt, frühe Stadien des Tumorstadiums können mit den bekannten Erkennungsmolekülen, die gegen Tumormarker gerichtet sind,
25 nicht bestimmt werden.

Ein weiterer Nachteil der bekannten Erkennungssubstanzen ist, daß sie nicht 'funktional' eingesetzt werden können. Funktional bedeutet, daß die Erkennungsmoleküle nicht nur so
30 an die Tumormarker binden, daß diese detektiert werden, sondern daß sie somit über Marker mit der Tumorzelle wechselwirken, daß die Tumorzelle in ihrem Wachstum beeinträchtigt wird. Es ist möglich, daß die Erkennungsmoleküle mit bestimmten Tumormarkern, die

beispielsweise auf Tumorzelloberflächen immobilisiert sind, so spezifisch interagieren, daß der durch die Tumormarker charakterisierte Tumor therapeutisch behandelt wird. Diese funktional aktiven Erkennungsmoleküle sind zum einen in der Lage, tumorzellenassoziierten Tumormarker zu detektieren und gleichzeitig durch ihre Bindung an diese tumorspezifische Struktur die Tumorzelle an einem weiteren Wachstum oder an einer Ausbildung von Metastasen zu hindern. Die bekannten Erkennungsmoleküle sind nachteilhafterweise in nur wenigen Fällen in der Lage, das Tumorstadium zu beeinflussen. In der Regel müssen daher zusätzlich Substanzen, die das Tumorstadium einschränken bzw. inhibieren, an den Antikörper gekoppelt werden, so daß dieser die „Fähre“ dieser Substanz ist, aber nicht das Agens der Behandlung.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, Erkennungsmoleküle bereitzustellen, mit denen zum einen Tumore einfach, sicher und effizient detektiert werden können, und die weiterhin in der Prophylaxe, Therapie und/oder Nachbehandlung von Tumoren eingesetzt werden können.

Die Erfindung löst dieses technische Problem durch die Bereitstellung von Erkennungsmolekülen umfassend eine Aminosäuresequenz, die die Aminosäuresequenz SEQ ID Nr. 1 und die Aminosäuresequenz SEQ ID Nr. 2 oder 3 und die Aminosäuresequenz SEQ ID Nr. 4, 5 oder 6 enthält, wobei die Erkennungsmoleküle das Antigen Core-1 spezifisch binden.

Die Definitionen der Begriffe, die im folgenden gemacht werden, treffen mutatis mutandis auf zuvor gemachte, diese und die nachfolgenden Ausführungen zu.

Unter dem Begriff Erkennungsmolekül versteht man erfindungsgemäß ein Molekül, das, insbesondere unter stringenten

Bedingungen, die Kohlenhydratstruktur Core-1 spezifisch bindet.

Unter Core-1 versteht man erfindungsgemäß die Kohlenhydratstruktur Gal β 1-3GalNAc, die als α -Anomer (Gal β 1-3GalNAc α) oder β -Anomer (Gal β 1-3GalNAc β) vorliegen kann. Bevorzugt ist hier die α -anomere Variante. Die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle können aber auch nur das alpha-Anomer Gal β 1-3GalNAc α oder beide Anomere Gal β 1-3GalNAc α und Gal β 1-3GalNAc β in gleicher Weise binden.

Unter einer spezifischen Bindung gegen Core-1 versteht man erfindungsgemäß eine Bindung, die nur Core-1, bevorzugt das α -Anomer, erkennt oder die Core-1 und Core-2 (Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α) erkennt. Die Erkennungsmoleküle zeigen dabei keine Kreuzreaktivität mit anderen Derivaten und Anomeren dieser Kohlenhydratstrukturen wie sie in Beispiel 7 aufgeführt sind. Die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle interagieren nicht mit Gal α 1-3GalNAc α , Gal α 1-3GalNAc β , GalNAc α , Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc α , Gal β 1-3(Neu5Ac α 2-6)GalNAc α , GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc α , GlcNAc α 1-3Gal β 1-3GalNAc α , GalNAc α 1-3Gal β und 3'-O-Su-Gal β 1-3GalNAc α unter den in Beispiel 7 beschriebenen Bedingungen. Die Bestimmung erfolgt dabei insbesondere über Spezifitätstests mit definierten synthetischen Kohlenhydratstrukturen.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst ein erfindungsgemäßes Erkennungsmolekül, das das Antigen Core-1 spezifisch bindet:

- a) eine erste Aminosäuresequenz, die die Aminosäuresequenz SEQ ID Nr. 1 und die Aminosäuresequenz SEQ ID Nr. 2 oder 3 und die Aminosäuresequenz SEQ ID Nr. 4 oder 5 oder 6 enthält; und

b) eine zweite Aminosäuresequenz, die die Aminosäuresequenz SEQ ID Nr. 7 oder 8 oder 9 und die Aminosäuresequenz SEQ ID Nr. 10 oder 11 und die Aminosäuresequenz SEQ ID Nr. 12 oder 13 enthält.

5

Die erste und zweite Aminosäuresequenz können dabei auf einem oder mehreren, dort bevorzugt zwei, Polypeptiden vorkommen.

Die erfindungsgemäßen Core-1 bindenden Erkennungsmoleküle sind
10 dadurch charakterisiert, dass sie ein definiertes Set von einzelnen Aminosäuresequenzen beinhalten. Die Aminosäuresequenz dieser Erkennungsmoleküle enthält ein oder zwei Tripletts definierter Sequenzen. Diese Sequenzen stellen die Bindungsdomänen dar und definieren die Spezifität des
15 Erkennungsmoleküls. Das 1-Triplett-Erkennungsmolekül enthält die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 1, die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 2 oder 3 und die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 4 oder 5 oder 6. Core-1-spezifische Erkennungsmoleküle, die durch zwei Tripletts definiert sind, enthalten für das erste Tripletts die
20 Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 1, die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 2 oder 3 und die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 4 oder 5 oder 6 und für das zweite Tripletts die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 7 oder 8 oder 9, die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 10 oder 11 und die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 12 oder 13. Dabei
25 können das erste und zweite Tripletts entweder auf einer oder mehreren Polypeptidketten vorkommen, die im letzteren Fall gemeinsam das bindende Erkennungsmolekül bilden. Im Weiteren werden diese Tripletts im Sinne der Erfindung als Triplettssequenz 1 für die erste umfasste Aminosäuresequenz und
30 als Triplettssequenz 2 für die zweite umfasste Aminosäuresequenz, siehe Definition a) und b) der obigen Beschreibung, bezeichnet. Das Erkennungsmolekül kann erfindungsgemäß ein Antikörper sein, insbesondere ein muriner, chimärer oder humaner IgG oder IgM, eine scFv-Struktur oder
35 eine andere.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft Erkennungsmoleküle, bei denen mindestens eine Aminosäuresequenz der SEQ ID NO. 1 bis 13 durch Mutation, Deletion und/oder Insertion verändert ist, wobei jedoch die Eigenschaft der Bindungsspezifität gegen Core-1 weiter besteht. Dies dient vorteilhafterweise der Verbesserung der Erkennungsmoleküle, beispielsweise in Bezug auf Affinität, Löslichkeit und/oder Produzierbarkeit.

10

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Modifikation eines Erkennungsmoleküls durch eine oder mehrere Mutationen in einer oder mehreren Aminosäuresequenzen ausgewählt aus SEQ ID NO. 1 bis 13, wobei einzelne Aminosäuren durch Aminosäuren mit analogen physikochemischen Eigenschaften ersetzt werden, die die 3-dimensionale Struktur der Bindungsdomäne des Erkennungsmoleküls mit Vorteil nicht grundlegend verändern, so dass die Core-1 Spezifität des Erkennungsmoleküls erhalten bleibt. Aminosäuren mit analogen physikochemischen Eigenschaften im Sinne der Erfindung können in 6 verschiedene Gruppen zusammengefaßt werden und sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Aminosäuren mit analogen physikochemischen Eigenschaften unberücksichtigt der molekularen Größe.

Eigenschaft oder funktionelle Gruppe	Aminosäure
aliphatisch	Glycin
	Alanin
	Valin
	Leucin
	Isoleucin
Hydroxy-Gruppe	Serin
	Threonin
Carboxy-Gruppe	Asparaginsäure

	Glutaminsäure
Amid-Gruppe	Asparagin
	Glutamin
Amino-Gruppe	Lysin
5	Arginin
aromatisch	Phenylalanin
	Tyrosin
	Tryptophan

10

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform der erfindungs-
 gemäßen Erkennungsmoleküle, die Core-1 spezifisch binden, ist
 mindestens eine Aminosäuresequenz der Aminosäuresequenzen SEQ
 ID NO. 1, 2, 3, 7, 8 und/oder 9 durch kanonische
 15 Strukturvarianten bzw. äquivalente Strukturen mit den
 Aminosäuresequenzen SEQ ID NO. 14 bis 45 ersetzt, wobei die
 SEQ ID NO. 1 durch eine Sequenz der Sequenzen SEQ ID NO. 14
 bis 17 (CDRH1), die SEQ ID NO. 2 oder 3 durch eine Sequenz der
 Sequenzen SEQ ID NO. 18 bis 27 (CDRH2) und die SEQ ID NO. 7
 20 oder 8 oder 9 durch eine Sequenz der Sequenzen SEQ ID NO. 28
 bis 45 (CDRL1) ersetzt ist.

Der generelle Zusammenhang zwischen einer Aminosäuresequenz
 und der Tertiärstruktur der von diesen Sequenzen gebildeten
 25 Loops ist dem Fachmann bekannt und wurde ausführlich
 untersucht [Rooman et al., 1989; Martin, Thornton, 1996]. Ein
 spezielles Beispiel stellen die Immunglobuline dar. Durch
 Analyse der Loop-Konformationen der hypervariablen Regionen
 (complementarity determining regions, CDRs) in der leichten
 30 und der schweren Kette von Antikörpermolekülen wurden
 sogenannte kanonische Klassen definiert [Chothia, Lesk, 1987;
 Chothia et al., 1986, 1989, 1992; Wu, Cygler, 1993]. Auf
 dieser Grundlage wurden die kanonischen Strukturvarianten SEQ
 ID NO. 14 bis 45 der SEQ ID NO 1, 2, 3, 7, 8 und 9 abgeleitet.

35

Die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO. 1 bis 13 oder deren Modifikationen in einem Core-1 spezifischen Erkennungsmolekül im Sinne der Erfindung bilden räumliche Strukturen aus, beispielsweise so genannte Loops, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie eine definierbare Tertiärstruktur und/oder Quartärstruktur besitzen. Die Bindungsregion eines Erkennungsmoleküls mit dem Core-1 Antigen wird von Aminosäureresten gebildet, die von bis zu sechs variablen Loops an der Oberfläche des Moleküls bereitgestellt werden, und die spezifisch mit Core-1 interagieren.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden Erkennungsmoleküle, die Core-1 spezifisch binden, bereitgestellt, bei denen mindestens eine Sequenz der Sequenzen des Triplets weggelassen wird, die nicht unmittelbar an der Interaktion mit dem Core-1 Antigen beteiligt ist.

In einer weiteren Ausführungsform umfassen die Erkennungsmoleküle mindestens eine der Aminosäuresequenzen der SEQ ID NO. 1 bis 13 oder deren oben beschriebene Varianten doppelt oder mehrfach, wobei diese Dopplungen auch als Varianten der gleichen Aminosäuresequenz vorkommen können. Alle die in diesem Abschnitt beschriebenen Erkennungsmoleküle erkennen vorteilhafterweise das Antigen Core-1 spezifisch. Im folgenden werden auch diese Erkennungsmoleküle, die streng genommen aufgrund des Weglassens oder Vervielfältigen von Sequenzen keine Triplettssequenzen tragen, trotzdem als Triplettssequenz 1 oder Triplettssequenz 2 bezeichnet, um die Anschaulichkeit zu vereinfachen.

In einer weiteren Ausführungsform, umfassen die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle, die das Core-1 Antigen spezifisch binden, Aminosäuresequenzen, die eine Homologie von mindestens 60%, vorzugsweise 70%, bevorzugt 80%, ganz

besonders bevorzugt 90% gegenüber den Sequenzen SEQ ID NO. 1 bis 13 aufweisen.

Die Erkennungsmoleküle im Sinne der Erfindung können weiterhin
5 Gerüstsequenzen umfassen, die die umfassenden Aminosäuresequenzen Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 1 und die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 2 oder 3 und die Aminosäuresequenz SEQ ID Nr. 4 oder 5 oder 6, oder deren oben beschriebene Varianten, voneinander trennen, und
10 Gerüstsequenzen, die die Aminosäuresequenzen SEQ ID Nr. 7 oder 8 oder 9 und die Aminosäuresequenz SEQ ID Nr. 10 oder 11 und die Aminosäuresequenz SEQ ID Nr. 12 oder 13, oder deren oben beschriebene Varianten, voneinander trennen. Die erste und zweite Aminosäuresequenz können dabei auf einem oder mehreren,
15 bevorzugt zwei, Polypeptidketten vorkommen. Diese Gerüstsequenzen werden im Sinne der Erfindung als Spacer oder Frameworksequenzen bezeichnet und können unterschiedliche Längen und Sequenzen haben. Dabei sind ebenfalls solche Erkennungsmoleküle ausdrücklich mit eingeschlossen, bei denen
20 nicht alle Aminosäuresequenzen der SEQ ID Nr. 1 bis 13 oder deren oben beschriebenen Varianten durch Spacer getrennt werden. Darüber hinaus haben die Erkennungsmoleküle vorzugsweise weitere flankierende Aminosäuresequenzen, die im Sinne der Erfindung auch als Gerüstsequenzen bezeichnet
25 werden.

Die Gerüstsequenzen haben insbesondere die Aufgabe, die beschriebenen Aminosäuresequenzen, die für die Core-1 spezifische Bindung der Erkennungsmoleküle verantwortlich
30 beziehungsweise beteiligt sind, in eine geeignete Anordnung und räumliche Struktur zu bringen, damit die Bindung an das Core-1 erfolgen kann. Es kann vorgesehen sein, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO. 1 bis NO. 13 ohne mindestens eine zusätzliche Aminosäuresequenz als Gerüstsequenz das Core-1
35 Antigen im Sinne der Erfindung nicht spezifisch binden können.

Darüber hinaus können die Gerüstsequenzen den Erkennungsmolekülen z.B. die notwendige biologische und chemische Stabilität geben, damit die räumliche Struktur effektiv aufgebaut und für die Funktion und Anwendung in einer geeigneten funktionellen Form, die die Core-1 Bindung beinhaltet, erhalten werden kann.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Triplettssequenzen in bestehende Proteine durch Austausch von Aminosäuresequenzen und/oder durch Hinzufügung eingefügt, wobei die bestehenden Proteinsequenzen als Gerüstsequenzen im Sinne der Erfindung dienen, beziehungsweise Gerüstsequenzen aus geeigneten Proteinen entnommen sind. Dabei können diese Gerüstsequenzen beispielsweise durch Mutationen, Deletionen oder Insertionen verändert werden. Hierbei bedient man sich dem Fachmann an sich bekannter Methoden der Molekularbiologie, Biochemie und Protein-Engineering. Bevorzugte Proteine hierfür sind Proteine der Immunglobulin-Superfamilie, Protease-Inhibitoren, Lektine, Helix-Bündel-Proteine und Lipocaline, wie sie z.B. offenbart sind in: Nygren und Uhlen, 1997; Nuttall SD et al., 1999 und Skerra, 2000.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform sind die Gerüstsequenzen Antikörpergerüstsequenzen aus einer oder verschiedenen Spezies oder Aminosäuresequenzen, die die Consensussequenz der Gerüstsequenzen muriner, humaner und/oder Antikörper anderer Säuger nachahmen. Eine Consensussequenz ist eine idealisierte Sequenz, in der repräsentativ an jeder Position die am meisten vorkommende Aminosäure steht, wenn viele existierende Sequenzen, beispielsweise aus Antikörper-Datenbanken, miteinander verglichen werden. Dabei sind die hier bevorzugten Erkennungsmoleküle dadurch gekennzeichnet, dass die Gerüstsequenzen für die erste Triplettssequenz 1 umfassend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 1, die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 2 oder 3 und die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 4 oder 5 oder 6, oder deren oben beschriebene Varianten,

Antikörpergerüstsequenzen der variablen schweren Kette VH, die in der Literatur auch als Framework-Sequenzen bezeichnet werden, sind und die Gerüstsequenzen für die Triplettssequenz 2 umfassend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 7 oder 8 oder 9, die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 10 oder 11 und die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 12 oder 13, oder deren oben beschriebenen Varianten, Antikörpergerüstsequenzen der variablen leichten Kette VL sind.

Bevorzugt sind weiterhin Antikörpergerüstsequenzen von Antikörpern aus Säugetieren, besonders bevorzugt sind Antikörpergerüstsequenzen humanen und/oder murinen Ursprungs. Die Gerüstsequenzen können dabei aus Antikörpergerüstsequenzen verschiedener Spezies kombiniert werden. Diese Antikörpergerüstsequenzen sind dem Fachmann bekannt und in verschiedenen Datenbanken zugänglich wie der Kabat-Datenbank (immuno.bme.nwu.edu) oder der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov). Ebenfalls können diese Antikörpergerüststrukturen durch weitere Aminosäuren verlängert, und/oder durch eine oder mehrere Mutationen, z.B. Deletionen und/oder Insertionen, verändert werden, wobei die spezifische Bindung an Core-1 erhalten bleibt.

Werden in einer bevorzugten Variante der Erfindung die Triplettssequenzen mit Antikörpergerüstsequenzen kombiniert, stellt das Erkennungsmolekül eine variable Kette eines Antikörpers oder eine davon abgeleitete Struktur dar.

Besonders bevorzugte Antikörpergerüstsequenzen als Gerüstsequenzen im Sinne der Erfindung sind für die variable schwere Kette die Aminosäuresequenzen entsprechend FRH1, FRH2, FRH3 und FHR4 in Tabelle 2 und für die variable leichte Kette die Aminosäuresequenzen entsprechend FRL1, FRL2, FRL3 und FRL4 in Tabelle 2, wobei die Aminosäuresequenzen der

Triplettssequenzen 1 und 2 mit den SEQ ID NO. 1 bis 13 den entsprechenden CDR-Regionen der Antikörper entsprechen. Dabei setzen sich die variable schwere (VH) bzw. leichte (VL) Antikörperkette wie folgt zusammen: die VH: FRH1-CDRH1-FRH2-
 5 CDRH2-FRH3-CDRH3-FRH4 und die VL: FRL1-CDRL1-FRL2-CDRL2-FRL3-CDRL3-FRL4. Tabelle 2 erläutert die Positionen im Detail. Die Positionen der einzelnen Aminosäuren bzw. Aminosäuresequenzen entsprechen der Nummerierung von Aminosäuren in Antikörpermolekülen nach Kabat.

10

Tabelle 2:

Name	Positionsbereich	Pos.	Aminosäure bzw. Aminosäuresequenz
FRH1	1 bis 30	1	Q oder E
		2	V
		3	Q, K oder T
		4	L
		5	K oder V
		6	E oder Q
		7	S
		8	G
		9	A
		10	E
		11	L oder V
		12	V oder K
		13	R oder K
		14	P
		15	G
		16	T oder A
		17	S
		18	V
		19	K
		20	I oder V
		21	S oder P

		22	C
		23	K
		24	A, V, S oder T
		25	S
		26	G
		27	Y, F, S oder D
		28	T
		29	F, L oder I
		30	T
CDRH1	31 bis 35		SEQ ID NO. 1 und Varianten
FRH2	36 bis 49	36	W
		37	V
		38	K oder R
		39	Q
		40	R oder A
		41	P
		42	G
		43	H oder Q
		44	G
		45	L
		46	E
		47	W oder R
		48	I oder M
		49	G
CDRH2	50 bis 65, wobei zusätzlich die Pos. 52a eingeführt ist		SEQ ID NO. 2 oder 3 und Varianten
FRH3	66 bis 94	66	K oder R
		67	A oder V
		68	T
		69	L oder M
		70	T
		71	A, L oder T

		72	D
		73	T
		74	S
		75	S oder T
		76	S
		77	T
		78	A
		79	Y
		80	M
		81	Q oder E
		82	L
		82a	S
		82b	S oder R
		82c	L
		83	T oder R
		84	S
		85	E
		86	D
		87	S oder T
		88	A
		89	V
		90	Y
		91	F oder Y
		92	C
		93	A
		94	Y, K oder R
CDRH3	95 bis 102, wobei zusätzlich die Pos. 100a und 100b eingeführt sind		SEQ ID NO. 4, 5 oder 6 und Varianten
FRH4	103 bis 113	103	W
		104	G
		105	Q
		106	G

		107	T
		108	T, S oder L
		109	V oder L
		110	T
		111	V
		112	S
		113	S oder A
FRL1	1 bis 23	1	D
		2	I, V oder L
		3	Q oder L
		4	M
		5	T
		6	Q
		7	T oder S
		8	P
		9	L
		10	S
		11	L
		12	P
		13	V
		14	S oder T
		15	L oder P
		16	G
		17	D oder E
		18	Q oder P
		19	A
		20	S
		21	I
		22	S
		23	C
CDRL1	22 bis 34, wobei zusätzlich die Pos. 27a, 27b, 27c, 27d und 27e eingeführt sind		SEQ ID NO. 7, 8 oder 9 und Varianten

FRL2	35 bis 49	35	W
		36	Y
		37	L
		38	Q
		39	K
		40	P
		41	G
		42	Q
		43	S
		44	P
		45	K oder Q
		46	L
		47	L
		48	I oder V
		49	Y
CDRL2	50 bis 56		SEQ. ID NO. 10 oder 11 und Varianten
FRL3	57 bis 88	57	G
		58	V
		59	P
		60	D
		61	R
		62	F
		63	S
		64	G
		65	S
		66	G
		67	S
		68	G
		69	T
		70	D
		71	F
		72	T
		73	L

		74	K
		75	I
		76	S
		77	R
		78	V
		79	E
		80	A
		81	E
		82	D
		83	L oder V
		84	G
		85	V
		86	Y
		87	Y
		88	C
CDRL3	89 bis 97		SEQ ID NO. 12 oder 13 und Varianten
FRL4	98 bis 108	98	F
		99	G
		100	G oder Q
		101	G
		102	T
		103	K
		104	L
		105	E
		106	I oder L
		106a	K
		107	R
		108	A

Die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO. 46 bis 79 entsprechen Aminosäuresequenzen mit bevorzugten Gerüstsequenzen für die variable schwere Kette. Die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO. 80

bis 94 entsprechen Aminosäuresequenzen mit bevorzugten Gerüstsequenzen für die variable leichte Kette.

Die zu verwendenden Techniken und Methoden zur Herstellung dieser Sequenzen sind dem Fachmann bekannt, ebenso ist der Fachmann in der Lage, geeignete Gerüstsequenzen und/oder Mutationen auszuwählen.

Im Sinne der Erfindung können die Core-1 spezifischen Erkennungsmoleküle in verschiedenen Formaten vorliegen. Die grundlegende Struktur des Erkennungsmoleküls sind eine oder mehrere Polypeptidketten, die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Triplettssequenz 1 oder Triplettssequenzen 1 und 2 und Gerüstsequenzen umfassen. Beispielsweise sind die Aminosäuresequenz der variablen schweren Kette mit den Gerüstsequenzen und den Triplettssequenzen 1 und die Aminosäuresequenz der variablen leichten Kette mit den Gerüstsequenzen und den Triplettssequenzen 2 nicht-kovalent oder kovalent miteinander verknüpft, und können auf einer oder mehreren Polypeptidketten liegen. Mehrere Polypeptidketten können kovalent, beispielsweise durch Disulfidbrücken, oder nicht-kovalent verbunden als Erkennungsmolekül vorliegen.

Zu den unterschiedlichen erfindungsgemäßen Formaten der Erkennungsmoleküle gehören insbesondere die Verknüpfung der Triplettssequenzen mit Aminosäuresequenzen, die über die oben beschriebenen Gerüstsequenzen hinausgehen. In einer bevorzugten Variante umfassen daher erfindungsgemäße Erkennungsmoleküle neben den Triplettssequenzen und den Gerüstsequenzen weitere Zusatzsequenzen. Zusatzsequenzen sind insbesondere Aminosäuresequenzen, die primär nicht der räumlichen Anordnung der Triplettssequenzen wie in Form der Gerüstsequenzen dienen, diese jedoch vorteilhaft durch sekundäre oder tertiäre Wechselwirkungen beeinflussen können. Beispielsweise stabilisieren Zusatzsequenzen in Form von

konstanten Domänen eines Antikörpers den Antikörper und bewirken eine Dimerisierung, wodurch es zu einer verbesserten Bindung des Antikörpers kommt, oder beispielsweise bewirkt eine Fusion eines scFv mit einer Domäne eines Bakteriophagenhüllproteins eine Aktivitätssteigerung der scFv-Bindung, wie sie z.B. in Jensen KB et al., 2002 offenbart ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen die Erkennungsmoleküle Aminosäuresequenzen mit Gerüstsequenzen auf Antikörperbasis und neben den Triplettssequenzen weitere Zusatzsequenzen. Die Zusatzsequenzen haben insbesondere mindestens eine der folgenden Aufgaben:

- a) Verknüpfung einer Triplettssequenz mit ihren entsprechend geeigneten Gerüstsequenzen mit mindestens einer weiteren Triplettssequenz mit ihren entsprechend geeigneten Gerüstsequenzen, um beispielsweise eine Bindungsfähigkeit zu erzeugen oder zu verbessern;
- b) der Stabilisierung der Domänen, beispielsweise durch einen Linker zwischen zwei Proteindomänen oder Aminosäuresequenzen, die mit anderen der gleichen oder einer zweiten Kette in Wechselwirkung treten;
- c) Effektorfunktionen für immunologische Aufgaben, beispielsweise durch Fusion mit Fc-Teil von Antikörpern, Chemokinen, Cytokinen, Wachstumsfaktoren oder Teilen davon, oder Antikörpern mit einer anderen Spezifität oder Fragmenten davon, zur Rekrutierung von Zellen des Immunsystems, beispielsweise Makrophagen, oder Teilen des Komplementsystems;
- d) Fusion mit Tags, beispielsweise Multimerisierungssequenzen - zum Beispiel μ -tail-Sequenz aus IgM oder Assoziationsdomäne aus p53 oder MBL - zur Multimerisierung der Core-1

bindenden Anteile für eine multivalente Bindung oder zur
 Aufreinigung der Erkennungsmoleküle, beispielsweise His-Tag
 oder zum Nachweis, beispielsweise myc-Tag oder zur
 Markierung oder Chelatisierung von Erkennungsmolekülen,
 5 beispielsweise durch Lysin-reiche Sequenzen.

Geeignete Strukturen sind dem Fachmann bekannt oder durch
 logische Schlussfolgerung aus dem Stand der Technik
 abzuleiten.

10

Dabei weiter bevorzugte Ausführungsformen sind erfindungs-
 gemäße Erkennungsmoleküle, die folgende Formate umfassen:
 single chain Antikörperfragment (scFv), Fv-Fragment, Fab-
 Fragment, F(ab)₂-Fragment, Multibody (Dia-, Tria-, Tetra-),
 15 Immunglobulin der Isotypen IgG, IgM, IgA, IgE, IgD oder deren
 Subklassen, beispielsweise IgG1, oder von Immunglobulinen
 abgeleitete Erkennungsmoleküle, die mindestens eine konstante
 Domäne umfassen.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform sind die
 erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle aus einer schweren und
 einer leichten Polypeptidkette zusammengesetzt, wobei die
 Aminosäuresequenzen der schweren und leichten Kette jeweils
 eine der oben beschriebenen Tripletstrukturen umfassen, die
 25 die CDR Regionen des Antikörpers darstellen, die
 entsprechenden Antikörpergerüstsequenzen, die die
 Frameworksequenzen der Antikörper darstellen, und
 Zusatzsequenzen, die mindestens eine der konstanten Domänen
 des Antikörperisotyps umfassen. Die beiden Ketten können
 30 miteinander kovalente Bindungen eingehen. Die konstanten
 Regionen und variablen Regionen können dabei Sequenzen von
 Antikörpern aus einer oder verschiedenen Spezies enthalten. Es
 können Teile von konstanten Domänen oder ganze konstante
 Domänen deletiert oder mutiert sein, beispielsweise um die
 35 Effektorfunktion der Zusatzsequenzen zu verändern,

beispielsweise die Bindung an Fc-Rezeptoren zu verhindern oder zu verbessern. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Erkennungsmolekül ein muriner, chimärisierter, humanisierter, partiell humaner oder humaner Antikörper oder Antikörperfragment. Die Chimärisierung erfolgt beispielsweise durch Verknüpfung der variablen Antikörperdomänen mit konstanten Antikörperdomänen oder Fragmenten der konstanten Domäne von Antikörpern verschiedener Spezies. Bevorzugt sind Sequenzen der konstanten Domänen humaner Antikörper.

10

Die Antikörpergerüstsequenzen können so gewählt werden, dass die Sequenzen weitestgehend homolog zu humanen Antikörpersequenzen sind. Die Wahl für den Speziesursprung der Gerüstsequenzen hängt auch von der Anwendung ab. So werden für eine therapeutische Anwendung in bestimmten Bereichen möglichst große Anteile an humanen Gerüstsequenzen bevorzugt, vor allem dann, wenn eine human anti-Maus Antikörperantwort (HAMA) vermieden werden soll. In anderen therapeutischen Bereichen ist ein Xenoanteil vorteilhaft, da er das Immunsystem in einer zusätzlichen Weise stimuliert. Eine Kombination beider ist in einigen Fällen besonders geeignet, vor allem dann, wenn in einer Erstimmunisierung ein Xenoanteil vorteilhaft und bei späteren Anwendungen ein spezieskonformer und damit humaner Anteil vorteilhaft ist.

25

Bevorzugt ist eine Homologie zu humanen Consensussequenzen, wobei für die variable schwere Kette die HuHI und für die variable leichte Kette die HuKII bevorzugt wird. Besonders bevorzugt ist eine Homologie zu humanen Keimbahnsequenzen, die dem Fachmann bekannt sind und zum Beispiel über die V BASE Datenbank (www.mrc-cpe.cam.ac.uk) zugänglich sind.

30

Die zu verwendenden Techniken und Methoden zur Herstellung dieser Sequenzen sind dem Fachmann bekannt, ebenso ist der Fachmann in der Lage, geeignete humane Sequenzen auszuwählen

35

und/oder möglicherweise notwendige Mutationen der Sequenzen durchzuführen.

5 In einer weiteren Ausführungsform sind zusätzlich die Triplettssequenzen, die im allgemeinen den Bindungs-Loops (CDR-Regionen) entsprechen und die bevorzugt starke Homologien zu den entsprechenden Sequenzbereichen in der humanen Keimbahnsequenz haben, diesen schrittweise durch einfache Mutationen angeglichen, ohne die spezifische Bindung an Core-1
10 zu beeinträchtigen. Erkennungsmoleküle mit diesen Sequenzen werden hier als partiell humane Antikörper oder Antikörperfragmente bezeichnet. Bevorzugte humanisierte Sequenzen stellen z.B. die Sequenzen SEQ ID NO. 56 bis 79 bzw. SEQ ID NO. 85 bis 94 dar.

15

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden bestimmte Aminosäuren der Antikörpergerüstsequenzen einer Spezies durch andere ausgetauscht, um normalerweise weniger immunogene Regionen zu generieren. Dies beinhaltet dem Fachmann an sich
20 bekannte Technologien, beispielsweise Technologien der Humanisierung, beispielsweise CDR-Grafting, Resurfacing, Chain-Shuffling mit Mutationen und Deimmunisierung durch Mutation oder Deletion von humanen MHC Epitopen.

25 In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um ein vom IgM abgeleitetes Erkennungsmolekül mit den entsprechenden konstanten Domänen eines IgM, bevorzugt humanen Sequenzen. Im Sinne der Erfindung setzten sich Immunglobuline aus der schweren Kette und der leichten Kette eines Antikörpers
30 zusammen, wobei bevorzugt 2 leichte und 2 schwere Ketten eine Einheit darstellen. Immunglobuline des IgM Typs bestehen meist aus 5 solchen Einheiten, die zusätzlich zu Disulfidbrücken durch die J-Kette miteinander verknüpft sind.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die J-Kette nicht vorhanden, wobei es ebenfalls zur Multimerisierung der Untereinheiten kommt, wobei hier hexa- und pentamere Strukturen vorliegen können.

5

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erkennungsmoleküle handelt es sich um Single chain Antikörperfragmente umfassend eine Tripletstruktur 1 mit entsprechenden oben beschriebenen Antikörpergerüstsequenzen, die die CDR Regionen des Antikörpers und Frameworksequenzen der variablen Domäne der schweren Kette von Antikörpern darstellen, und eine Tripletstruktur 2 mit den entsprechenden oben beschriebenen Antikörpergerüstsequenzen, die die CDR Regionen des Antikörpers und Frameworksequenzen der variablen Domäne der leichten Kette von Antikörpern darstellen, die kovalent miteinander in Form eines Fusionsproteins verknüpft sind. Hierbei sind die Sequenzen direkt oder durch einen Linker miteinander verknüpft. Bevorzugt sind hier scFv Formate ohne Linker oder mit einem Linker von 1 bis 9 Aminosäuren Länge. Diese scFv Antikörper bilden multimerere Strukturen (beispielsweise Dia-, Tria-, Tetra-bodies), die im Sinne der Erfindung auch als Multibodies bezeichnet werden und zeigen aufgrund der Multivalenz höhere Avidität zum Core-1 Antigen. Es wurden Core-1 spezifische Erkennungsmoleküle im scFv Format mit verschiedenen Linkerlängen konstruiert (SEQ ID NO. 95 bis 106) und ihre Bindungscharakteristik im ELISA untersucht. Eine schrittweise Linkerverkürzung führte zu einer Erhöhung der Bindung an Asialoglykophorin, einem Core-1 tragenden Glykoprotein, wie in Abbildung 3 dargestellt. Die besten Bindungseigenschaften zeigten hierbei die Varianten mit der SEQ ID NO. 104 und 105. Diese multivalenten Konstrukte im Dia/Triabody Format sind besonders bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung und sind aufgrund verbesserter pharmakokinetischer Eigenschaften für die Tumorthherapie von Vorteil.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform sind die Erkennungsmoleküle fusioniert, chemisch gekoppelt, kovalent oder nicht-kovalent assoziiert mit (i) Immunglobulindomänen verschiedener Spezies, (ii) Enzymmolekülen, (iii) Interaktionsdomänen, (iv) Signalsequenzen, (v) Fluoreszenzfarbstoffen, (vi) Toxinen, (vii) katalytischen Antikörpern, (viii) einem oder mehreren Antikörpern oder Antikörperfragmenten mit anderer Spezifität, (ix) zytolytischen Komponenten, (x) Immunmodulatoren, (xi) Immuneffektoren, (xii) MHC-Klasse I oder Klasse II Antigenen, (xiii) Chelatoren zur radioaktiven Markierung, (xiv) Radioisotopen, (xv) Liposomen, (xvi) Transmembrandomänen, (xvii) Viren und/oder Zellen. Außerdem können die Erkennungsmoleküle insbesondere mit einem Tag fusioniert sein, die die Detektion des Erkennungsmoleküls und deren Aufreinigung ermöglichen, wie zum Beispiel ein Myc-Tag oder ein His-Tag. Technologien zur Herstellung dieser Konstrukte sind dem Fachmann bekannt, ebenso ist der Fachmann in der Lage, geeignete Sequenzen und Komponenten auszuwählen und mit den erfindungsgemäßen Erkennungsmolekülen in geeigneter Weise zu verbinden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die beschriebenen Erkennungsmoleküle auf Antikörper- oder Antikörperfragment-Basis mit Peptiden oder Proteinen, die nicht von Immunglobulinen abgeleitet sind, fusioniert. Beispielsweise wird die Multimerisierungsdomäne eines Nicht-Immunglobulinmoleküls mit einem scFv fusioniert, insbesondere das C-terminale Ende der alpha-Kette des C4 Bindungsproteins, wie es bei Tonye Libyh M. et al., 1997 beschrieben ist, und somit ein multivalentes Erkennungsmolekül konstruiert.

In einer weiteren Ausführungsform wird ein scFv mit einer Transmembrandomäne eines Nicht-Immunglobulinmoleküls fusioniert, beispielsweise mit der Transmembrandomäne des c-erb B2,

des h-PDGFR, des humanen Transferrinrezeptors oder des humanen Asialoglykoprotein-Rezeptors (Liao et al., 2000), und somit die Expression von Bindungsmolekülen auf der Oberfläche von Zellen ermöglicht.

5

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung umfasst erfindungsgemäße Erkennungsmoleküle, die weiterhin Aminosäuresequenzen umfassen, die spezifisch an Makrophagen oder andere Immuneffektorzellen binden. Beispielsweise umfassen die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle weiterhin eine Antikörperbindungsstelle gegen CD64, wodurch es in Form eines bispezifischen Antikörpers beziehungsweise Antikörperfragments (Diabodies) zur Bindung von Makrophagen an Core-1 positive Tumorzellen kommt, was zu deren Bekämpfung und/oder Zerstörung führt.

15

Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft radioaktiv markierte Core-1 spezifische Erkennungsmoleküle. Eine bevorzugte Form sind Erkennungsmoleküle auf der Basis von Antikörpern oder Antikörperfragmenten. Eine weitere bevorzugte Ausführungsform sind radioaktiv markierte erfindungsgemäße Erkennungsmoleküle im single chain Format (einschließlich als Dia-, Tria-, Tetra-bodies). Weitere bevorzugte Formen sind radioaktiv markierte single chain Antikörperfragmente und ganze Immunglobuline, beispielsweise erfindungsgemäße chimäre oder humanisierte IgG oder IgM Antikörper oder humanisierte Antikörperfragmente. Die Erfindung ist selbstverständlich nicht auf diese Antikörper, die radioaktive Markierung und diese Formate der Antikörper beschränkt.

20

Antikörperfragmente wie die bevorzugten multivalenten scFv Fragmente insbesondere ohne oder mit sehr kurzem Linker bieten gegenüber intakten monoklonalen Antikörpern einen Vorteil für das Targeting von soliden Tumoren. Bei intakten Antikörpern, die in Biodistributionsstudien eine spezifische Anreicherung

35

im Tumoreal zeigen, fällt bei genauer Untersuchung des Tumors eine inhomogene Antikörperverteilung mit vornehmlicher Anreicherung im Randbereich auf. Zentral gelegene Tumorteile werden aufgrund von Tumornekrosen, inhomogener Antigenverteilung sowie einem erhöhten interstitiellen Gewebedruck mit diesen Antikörperkonstrukten nicht erreicht. Kleinere Antikörperfragmente zeigen dagegen eine schnelle Tumormarkierung, dringen tiefer in den Tumor ein und werden gleichzeitig relativ schnell aus der Blutbahn entfernt. Die Dissoziationskonstante von monovalenten Antikörperfragmenten wie Fabs oder scFv ist allerdings oftmals zu niedrig, was in einer kurzen Verweildauer an den Tumorzellen resultiert. Deshalb bieten multivalente Antikörperkonstrukte wie Multibodies (Diabodies, Triabodies/Tetrabodies), $F(ab')_2$ und andere Minibodies (multivalente Antikörperkonstrukte bestehend aus der Bindungsdomäne und einer Multimerisierungssequenz, beispielsweise scFv und CH3 Domäne eines IgG) in der Tumorthherapie viele Vorteile. Multivalenten Konstrukte im Dia/Triabody Format sind bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung und sind aufgrund verbesserter pharmakokinetischer Eigenschaften für die Tumorthherapie von Vorteil und wurden zur Verwendung in der Tumorthherapie weiter entwickelt. Sie können als Vehikel für die spezifische Anreicherung von zum Beispiel zytotoxischen Substanzen wie Chemotherapeutika oder Radionuklide im Tumor verwendet werden. Durch geeignete Radionuklidwahl können Tumorzellen über eine Distanz von mehreren Zelldurchmessern abgetötet werden, wodurch auch Antigen-negative Tumorzellen in einem Tumoreal erfasst und die schlechte Penetration der Antikörper in solide Tumoren zumindest teilweise ausgeglichen werden können.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der Erfindung sind radioaktiv-markierten Multibodies - insbesondere wie unter Beispiel 9 näher ausgeführt -, die besonders vorteilhafte pharmakokinetischen Eigenschaften vereinen mit einer in der

Kombination gegenüber ganzen Immunglobulinen und scFv verbesserten Tumorretention, Tumorpenetration, Serumhalbwertszeit und Serum zu Tumor-Verteilungsverhältnis. Weitere Vorteile sind die hohe Avidität und die bakterielle Expression, die es erlaubt, kostengünstig diese Erkennungsmoleküle herzustellen. Damit eignet sich dieses besondere Format der erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle vorteilhafterweise bevorzugt für die Behandlung von kleinen Primärtumoren, Metastasen und minimal residual Erkrankungen.

Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung sind nicht radioaktiv markierte Erkennungsmoleküle. Eine bevorzugte Form hierbei sind Erkennungsmoleküle auf der Basis von Antikörpern oder Antikörperfragmenten.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform sind chimäre und humanisierte Immunglobuline auf der Basis von IgM Molekülen zur Inhibition der Lebermetastasierung und zur Bekämpfung residualer Tumorzellen.

Weitere bevorzugte Ausführungsformen sind toxin- oder Zytostatika-gekoppelte erfindungsgemäße chimärisierte oder humanisierte IgG und IgM basierte Erkennungsmoleküle und im Besonderen Multibodies (Dia- Tria-, Tetrabodies) mit besonders vorteilhaften pharmakokinetischen Eigenschaften wie oben ausgeführt.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform sind Liposomen, die beispielsweise mit Toxinen oder Zytostatika beladen sind, und die auf ihrer Oberfläche erfindungsgemäße Erkennungsmoleküle tragen.

Der Fachmann ist in der Lage, geeignete Radioisotope, Toxine und Zytostatika auszuwählen. Geeignete Techniken, Verfahren, Dosierungen und Formulierungen sind dem Fachmann bekannt.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung sind Effektorzellen des Immunsystems, auf deren Oberfläche erfindungsgemäße Erkennungsmoleküle gebunden sind, die die Effektorzellen zu Core-1 tragenden Tumorzellen dirigieren/adressieren und dadurch deren Bekämpfung und/oder Zerstören vermitteln. Bevorzugte Effektorzellen sind Makrophagen, dendritische Zellen und NK-Zellen, die aus dem Patienten gewonnen werden und ex vivo mit den Erkennungsmolekülen gekoppelt werden. Weiter bevorzugt sind Zelllinien dieser Zelltypen. Die Kopplung erfolgt beispielsweise durch bispezifische Erkennungsmoleküle, die neben den Core-1 spezifischen Anteilen weiterhin Aminosäuren umfassen, die eine Bindung an die Effektorzellen vermitteln. Beispielsweise sind dies bispezifische Antikörper, Komplementanteile oder konstante Domänen von Antikörpern.

Eine weiter bevorzugte Ausführungsform sind hierbei Makrophagen aus dem Patienten, die nach Gewinnung mit einem bispezifischen Antikörper beispielsweise in Form ganzer Antikörper, bevorzugt chemisch gekoppelter Fab-Fragmente oder weiter bevorzugt Diabodies, die zum einen CD64 erkennen und zum anderen erfindungsgemäß Core-1 spezifisch sind. Diese Makrophagen, die über die CD64 Spezifität die bispezifischen Erkennungsmoleküle tragen, werden dem Patienten in einer geeigneten Formulierung wieder zugeführt, um den Core-1 positiven Tumor zu bekämpfen. Die hierzu verwendeten Techniken und die geeigneten Verfahren, Dosierungen und Formulierungen sind dem Fachmann bekannt. Eine weiter bevorzugte Ausführungsform sind Makrophagen aus dem Patienten, die nach Gewinnung mit einem erfindungsgemäßen Core-1 spezifischen Antikörper oder Antikörperfragment, die den konstanten Teil eines Antikörpers umfassen, der an Makrophagen über die an sich bekannten Fc-Rezeptoren bindet. Dabei können die Erkennungsmoleküle entweder als ganze Antikörper, bevorzugt

chimäre oder humanisierte IgG oder IgM, oder als Antikörperfragment, beispielsweise scFv, Fab oder Multibodies in Form eines Fusionsproteins oder chemisch gekoppelt mit dem dem Fachmann bekannten Teil der konstanten Domäne von Antikörpern, an die Makrophagen binden. Diese die Erkennungsmoleküle tragenden Makrophagen werden dem Patienten in einer geeigneten Formulierung wieder zugeführt, um den Core-1 positiven Tumor zu bekämpfen. Die hierzu verwendeten Techniken und die geeigneten Verfahren, Dosierungen und Formulierungen sind dem Fachmann bekannt.

Eine weiter bevorzugte Ausführungsform sind Zelllinien oder Zellen aus dem Körper wie die oben beschriebenen Effektorzellen, die mit Molekülen transfiziert werden, die erfindungsgemäße Core-1 spezifische Erkennungsmoleküle und weiterhin Elemente umfassen, die eine Expression und eine Verankerung in der Membran bewirken, beispielsweise transmembrane Domäne, und die Aktivierung der Effektorzellen bei Kontakt mit einer Core-1 tragenden Tumorzelle vermitteln. Die entsprechenden Elemente sind dem Fachmann bekannt. Beispielsweise wird eine dendritische Zelllinie mit einem Vektor transfiziert, der ein Erkennungsmolekül umfasst, das ein erfindungsgemäßes scFv oder Multibody und eine Transmembrandomäne und eine aktivierende Domäne umfasst. In einem anderen Beispiel werden dazu Makrophagen viral transfiziert. Diese die Erkennungsmoleküle tragenden Effektorzellen werden einem Patienten in einer geeigneten Formulierung zugeführt um den Core-1 positiven Tumor zu bekämpfen. Die hierzu verwendeten Techniken und die geeigneten Verfahren, Dosierungen und Formulierungen sind dem Fachmann bekannt.

Die Erfindung betrifft auch Nukleinsäuremoleküle, die ein oder mehrere genetische Sequenzen umfassen, die mindestens eines der oben beschriebenen erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle

und/oder Konstrukte kodieren. Aufgrund des degenerierten genetischen Codes können diese Nukleinsäuremoleküle sehr unterschiedliche Sequenzen haben. Die Wahl der Codons ist ebenfalls von der Zelle abhängig, die für die Herstellung des Erkennungsmoleküls verwendet wird, da in unterschiedlichen Zellen aus unterschiedlichen Organismen häufig unterschiedliche Codons bevorzugt werden und die Expressionsrate stark beeinflusst werden kann, beispielsweise sind die in eukaryontischen Genen bevorzugt verwendeten Codons AGA und AGG für Arginin in Bakterien nur selten vertreten. Hier treten die Codons CGC und CGU deutlich häufiger auf. Das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül ist in bevorzugten Ausführungsformen eine genomische DNA, eine cDNA und/oder eine RNA. Die Kriterien zur Wahl geeigneter Codons und die Herstellung eines geeigneten Nukleinsäuremoleküls sind dem Fachmann bekannt.

Weiterhin betrifft die Erfindung Vektoren zur Expression der Erkennungsmoleküle insbesondere in Zellen. Unter einem Vektor versteht man im Sinne der Erfindung ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, das zur Expression des Erkennungsmoleküls dient und das eine Nukleinsäuresequenz, die ein oder mehrere genetische Sequenzen umfasst, die mindestens eines der oben beschriebenen Erkennungsmoleküle kodieren, und insbesondere mindestens einen Promotor umfasst, der die Expression des Erkennungsmoleküls bewirkt. Vektoren können dabei selbstverständlich weitere Elemente umfassen, die dem Fachmann bekannt sind und die beispielsweise der Vermehrung von Vektoren zur Herstellung in geeigneten Zellen und zur Klonierung dienen. Die Nukleinsäuresequenzen können auf einem oder mehreren Vektoren vorliegen, beispielsweise wird in einer bevorzugten Ausführungsform die schwere Kette eines erfindungsgemäßen Immunglobulins durch einen und die leichte Kette durch einen anderen Vektor kodiert. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die variable Domäne der leichten Kette und die variable Domäne der schweren

Kette auf dem gleichen Vektor unter einem Promotor als Fusionsprotein kodiert. Außerdem können im Sinne der Erfindung Nukleinsäuresequenzen, die Teile eines Erkennungsmoleküls kodieren, durch unterschiedliche dem Fachmann bekannte Promotoren exprimiert werden. In einer weiteren Ausführungsform können die unterschiedlichen Nukleinsäuresequenzen auf einem gemeinsamen Vektor liegen. Dabei kann jede Sequenz durch einen eigenen, gleichen oder unterschiedlichen, Promotor exprimiert werden oder die Sequenzen können in einem bicistronischen Vektor unter einem Promotor vorliegen. Bevorzugt werden durch die unterschiedlichen Promotoren unterschiedliche Expressionsraten der Teile der Erkennungsmoleküle erreicht, die eine Bildung des gesamten Erkennungsmoleküls gegenüber einer gleichen Expressionsrate der verschiedenen Teile verbessert. Weiterhin bevorzugt werden Promotoren verwendet, die induzierbar sind, um eine Expression des Erkennungsmoleküls zu verbessern. Besonders bevorzugt umfassen die Vektoren weiterhin andere dem Fachmann bekannte regulatorische Elemente, beispielsweise Enhancer, die die Expression des Erkennungsmoleküls oder Teile davon verstärken, beispielsweise der CMV Enhancer oder Immunglobulin-Enhancer-Sequenzen. Bevorzugt umfassen die Nukleinsäuremoleküle und Vektoren zusätzlich Nukleinsäuresequenzen, die als Signalsequenzen zur Sekretion des Erkennungsmoleküls oder Teilen davon dienen, die dem Fachmann an sich bekannt sind, beispielsweise PelB, OmpA oder MalE für prokaryontische Zellsysteme bzw. das Signalpeptid des T-Zellrezeptors, der Immunglobulinketten, des t-PA oder EPO für eukaryontische Zellsysteme [Boel et al., 2000; Herrera et al., 2000]. Dies erleichtert vorteilhafterweise die Reinigung und/oder verbessert die Ausbeute der Erkennungsmoleküle. Die Verfahren zur Herstellung der oben beschriebenen Nukleinsäuren und Vektoren, geeigneter Promotoren, Enhancer und Vektorkonstrukte sowie die Kriterien zu deren Wahl sind dem Fachmann bekannt und werden in den Beispielen näher erläutert.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung umfasst der erfindungsgemäße Vektor weiterhin Nukleinsäuresequenzen, die für virale Proteine kodieren. Als eine besondere Form eines Vektors wird dabei der Virus selbst bezeichnet, dessen genetisches Material eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die für ein erfindungsgemäßes Erkennungsmolekül kodiert. In einer bevorzugten Form ist das Erkennungsmolekül ein Fusionsprotein mit einem Virushüllprotein oder Teilen davon, das es ermöglicht, dass nicht nur das genetische Material die Nukleinsäuresequenz des Erkennungsmoleküls umfasst, sondern auch das Erkennungsmolekül selbst auf der Oberfläche des Virus bindungsaktiv vorliegt, beispielsweise ein erfindungsgemäßes scFv Erkennungsmolekül als Fusionsprotein mit einem Hüllprotein von für gentherapeutische Anwendungen geeigneten Adenoviren, Poxviren oder Vacciniaviren. Dies vermittelt die Adressierung des Virus zu einer Core-1 exprimierenden Tumorzelle, wodurch es zur Expression des Erkennungsmoleküls in der Tumorzelle kommt. Dies kann zur Expression des Erkennungsmoleküls in vivo im Organismus oder in vitro in der Zellkultur verwendet werden. Bevorzugt werden dabei bekannte Systeme verwendet, die einen Helfervirus zur Replikation verwenden, um beispielsweise die Sicherheit eines diesen Vektor umfassenden gentherapeutischen Verfahrens zu gewährleisten. Die Verfahren zur Herstellung der beschriebenen viralen Vektoren, zur Infektion und Expression der Erkennungsmoleküle sind dem Fachmann bekannt.

In einer weiteren besonderen Ausführungsform umfasst der erfindungsgemäße Vektor ein Fusionsprotein aus einem erfindungsgemäßen Erkennungsmolekül und einem Protein oder Peptid, das spezifisch an ein Virus bindet. Die gewonnenen Erkennungsmoleküle können so mit Vorteil zur Adressierung des Virus an eine Core-1 exprimierende Zelle verwendet werden. So kann z.B. der Transfer des genetischen Materials über

Infektionen vermittelt werden, wodurch es ermöglicht wird, spezifische Moleküle, die durch das genetische Material des Virus kodiert werden, in den Zellen in vivo im Organismus in Form einer Gentherapie oder in vitro in der Zellkultur zu exprimieren.

Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Gewinnung der Erkennungsmoleküle umfassend das Einbringen von ein oder mehreren erfindungsgemäßen Vektoren, die ein oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuremoleküle enthalten, in eine geeignete Wirtszelle, die Kultivierung dieser Wirtszelle unter geeigneten Bedingungen und die Bereitstellung von ein oder mehreren Erkennungsmolekülen aus den Zellen oder dem Kulturmedium. Unter dem Begriff „Einbringen von Vektoren“ versteht man im Sinne der Erfindung dem Fachmann an sich bekannte Technologien mit denen der Vektor in eine Wirtszelle gebracht wird, beispielsweise Elektroporation, Transfektion unter Verwendung kationischer Lipide oder Infektion und dort transient oder stabil verbleibt. Unter dem Begriff „Bereitstellung von einem oder mehreren Erkennungsmolekülen“ versteht man im Sinne der Erfindung dem Fachmann an sich bekannte Technologien mit denen die während des Kultivierungsprozesses exprimierten Erkennungsmoleküle aus dem Kulturüberstand und/oder Zellen gewonnen werden, beispielsweise unterschiedliche proteinchemische Reinigungsschritte beispielsweise Fraktionierung, Konzentrierung, Fällungen, und/oder Chromatographie. Die in dem Verfahren zu verwendenden Techniken und Methoden sind dem Fachmann bekannt, ebenso ist der Fachmann in der Lage, geeignete Wirtszellen und Kultivierungsbedingungen sowie Methoden zur Bereitstellung aus den Zellen und/oder dem Kulturüberstand auszuwählen. Hierbei wählt der Fachmann beispielsweise, wie bereits oben ausgeführt, Nukleinsäuresequenzen mit geeigneten Codons und Promotorsequenzen abgestimmt auf die Wirtszelle, um eine möglichst starke Expression von aktiven Erkennungsmolekülen zu

gewinnen. In einer bevorzugten Ausführungsform verwendet der Fachmann beispielsweise affinitätschromatographische Schritte, beispielsweise Chromatographie an Protein A oder Protein G oder Protein L oder beispielsweise Metallionen-Affinitätschromatographie über einen zusätzlich eingefügten His-Tag. In den Beispielen ist dies beispielhaft näher ausgeführt.

Der Begriff "Gewinnung" umfasst neben den zuvor explizit genannten Schritten auch zusätzliche Schritte, wie etwa Vorbehandlungen des Ausgangsstoffes oder Weiterbehandlungen des Endproduktes. Vorbehandlungsverfahren sind an sich dem Fachmann bekannt. Weiterbehandlungsverfahren umfassen neben den oben beschriebenen Bereitstellungsverfahren beispielsweise auch die endgültige Zusammensetzungen und/oder Formulierung des mit dem Herstellungsverfahren gewonnenen Erkennungsmoleküls in geeigneten Verwendungs- und/oder Darreichungsformen. Die Art der Verwendungs- oder Darreichungsform, z.B. Lösung, Lyophilisat oder Tablette, hängt hierbei von der beabsichtigten Verwendung ab. Dem Fachmann ist hierbei bekannt, welche Darreichungsform sich für welchen Verwendungszweck eignet. Je nach Darreichungsform kann das durch das erfindungsgemäße Verfahren hergestellte Erkennungsmolekül zusammen mit Hilfs-, Träger- oder weiteren Wirkstoffen vorliegen. Hilfsstoffe sind hierbei vorzugsweise Adjuvantien, weitere Wirkstoffe, vorzugsweise immunstimulatorische Moleküle, wie Interleukine. Das mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte Erkennungsmolekül kann auch in Weiterbehandlungsschritten chemisch modifiziert werden. Vorzugsweise wird das Erkennungsmolekül hierbei mit einem oder mehreren weiteren Molekülen in geeigneter Weise, d.h. durch chemische oder physikalische Interaktion, verbunden. Als weitere Moleküle im Sinne der Erfindung dienen bevorzugt anderen Proteine oder Peptide, die mit dem durch das erfindungsgemäße Verfahren hergestellten Erkennungsmolekül

kovalent oder nicht-kovalent verknüpft werden, beispielsweise um bispezifische Erkennungsmoleküle herzustellen, indem ein erfindungsgemäßes Erkennungsmolekül, das spezifisch das Core-1 Antigen erkennt, mit einem zweiten Molekül verknüpft wird, das
5 beispielsweise eine Immuneffektorzelle (beispielsweise Makrophage, NK-Zellen, Dendritische Zellen) spezifisch bindet oder beispielsweise eine Verknüpfung mit Interleukinen (beispielsweise IL-2, IL-7, IL-12, IL-15), Chemokinen oder Wachstumsfaktoren, wodurch über die Wirkung dieser Moleküle
10 über die Bindung des erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküls Immuneffektoren an die Core-1 positiven Tumorzellen dirigiert werden und diese beispielsweise bekämpfen und/oder zerstören. Diese weiteren Moleküle oder Teile davon können wie bereits weiter oben beschrieben auch Teil des Erkennungsmoleküls
15 selbst sein und werden in diesem Fall nicht über die hier beschriebenen chemischen oder physikalischen Methoden nach der Expression des Erkennungsmoleküls verknüpft. Unter „Immuneffektoren“ versteht man im Sinne der Erfindung solche Komponenten der Erfindung die direkt oder indirekt eine
20 Bekämpfung und/oder Zerstörung von Core-1 positiven Tumorzellen bewirken können, beispielsweise Immuneffektorzellen, wie beispielsweise Makrophagen, NK-Zellen, Dendritische Zellen, oder Effektormoleküle, wie beispielsweise Proteine oder Peptide des Komplementsystems. Als weitere
25 Moleküle im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens sind besonders Substanzen geeignet, die eine therapeutische oder diagnostische Wirkung entfalten, beispielsweise Radioisotope oder Toxine. Diese Substanzen werden über an sich bekannte Verfahren mit den Erkennungsmolekülen verknüpft, beispielsweise
30 werden Radioisotope entweder direkt eingelagert (beispielsweise Iod) oder über einen kovalent gekoppelten Chelator (beispielsweise Yttrium, Indium, Bismut) gebunden. Die Schritte des Weiterbehandlungsverfahrens sind dem Fachmann bekannt.

Die zur Expression der Erkennungsmoleküle erfindungsgemäß verwendeten Zellen können prokaryontische oder eukaryontische Zellen sein, beispielsweise Bakterien-, Hefe- (bevorzugt *S.cerevisiae* oder *P.pastoris*), Insekten- (*D.melanogaster*),
5 Pflanzen-, Säugerzellen (bevorzugt Hamster-, Maus- oder humane Zelllinien) oder Organismen wie transgene Tiere und Pflanzen. Vorzugsweise werden zur Expression der erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle in einem prokaryontischen System *E.coli* und zur Expression in einem eukaryontischen System die
10 Säugerzelllinien NS0, SP2/0, CHO-K1, CHOdhfr-, COS-1, COS-7, HEK293, K562, Namalwa oder Percy 6 verwendet.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung Wirtszellen, die durch das oben beschriebene Verfahren hergestellt wurden und
15 mit Hilfe derer erfindungsgemäße Erkennungsmoleküle hergestellt werden können. Selbstverständlich können die Wirtszellen Teil eines Klons sein oder ihn selber darstellen. Die Erfindung betrifft auch Organismen, die erfindungsgemäße Wirtszellen umfassen. Die zu verwendenden Techniken und
20 Methoden zur Herstellung dieser Organismen sind dem Fachmann bekannt.

Die Erfindung betrifft weiterhin Zusammensetzungen für therapeutische, prophylaktische oder diagnostische Zwecke
25 umfassend mindestens ein erfindungsgemäßes Erkennungsmolekül in einer geeigneten, insbesondere einer pharmazeutisch geeigneten Form oder Zusammensetzung. Die pharmazeutische Zusammensetzung umfaßt insbesondere zusätzliche Stoffe und Substanzen, beispielsweise medizinische und/oder pharma-
30 zeutisch-technische Hilfsstoffe. Im Sinne der Erfindung gelten als Arzneimittel sowohl solche pharmazeutischen Zusammensetzungen, die für therapeutische und prophylaktische Zwecke verwendet werden, als auch solche pharmazeutischen Zusammensetzungen, die in vivo als Diagnostikum eingesetzt werden. In
35 einer weiteren bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um

Zusammensetzungen für die ex vivo Diagnostik die zusätzliche Stoffe und Substanzen enthalten können. Diese Ausführungsform ist unter der Beschreibung für die Diagnostika näher ausgeführt.

5

„Arzneimittel oder pharmazeutische Zusammensetzungen“, die vorliegend synonym verwendet werden, sind erfindungsgemäß Stoffe und Zubereitungen aus Stoffen, die dazu bestimmt sind, durch Anwendung am oder im menschlichen Körper Krankheiten, Leiden, Körperschäden oder krankhafte Beschwerden zu heilen, zu lindern oder zu verhüten. Medizinische Hilfsstoffe sind erfindungsgemäß solche Stoffe, die zur Produktion als aktive Ingredienzien von Arzneimitteln eingesetzt werden. Pharmazeutisch-technische Hilfsstoffe dienen der geeigneten Formulierung des Arzneimittels oder der pharmazeutischen Zusammensetzung und können sogar, sofern sie nur während des Herstellungsverfahrens benötigt werden, anschließend entfernt werden oder können als pharmazeutisch verträgliche Träger Teil der pharmazeutischen Zusammensetzung sein. Beispiele für pharmazeutisch verträgliche Träger sind nachstehend aufgeführt. Die Arzneimittelformulierung oder Formulierung der pharmazeutischen Zusammensetzung erfolgt gegebenenfalls in Kombination mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger und/oder Verdünnungsmittel. Beispiele für geeignete pharmazeutisch verträgliche Träger sind dem Fachmann bekannt und umfassen z.B. Phosphat-gepufferte Kochsalzlösungen, Wasser, Emulsionen wie z.B. Öl/Wasser-Emulsionen, verschiedene Arten von Detergenzien, sterile Lösungen, etc. Arzneimittel oder pharmazeutische Zusammensetzungen, die solche Träger umfassen, können mittels bekannter konventioneller Methoden formuliert werden. Diese Arzneimittel oder pharmazeutischen Zusammensetzungen können einem Individuum in einer geeigneten Dosis verabreicht werden, z.B. in einem Bereich von $1\mu\text{g}$ bis 10 g an Erkennungsmolekülen pro Tag und Patient Bevorzugt werden dabei Dosen von 1 mg bis 1 g. Die Verabreichung kann auf

verschiedenen Wegen erfolgen, beispielsweise intravenös, intraperitoneal, intrarektal, intragastrointestinal, intranodal, intramuskulär, lokal, beispielsweise in den Tumor, aber auch subkutan, intradermal oder auf der Haut oder über die Schleimhäute. Die Verabreichung von Nukleinsäuren kann auch in Form von Gen-Therapie geschehen, beispielsweise über weiter oben beschriebene virale Vektoren. Die Art der Dosierung und des Verabreichungsweges kann vom behandelnden Arzt entsprechend den klinischen Faktoren bestimmt werden. Es ist dem Fachmann bekannt, dass die Art der Dosierung von verschiedenen Faktoren abhängig ist, wie z.B. der Größe, der Körperoberfläche, dem Alter, dem Geschlecht oder der allgemeinen Gesundheit des Patienten, aber auch von dem speziellen Mittel, welches verabreicht wird, der Dauer und Art der Verabreichung und von anderen Medikamenten, die möglicherweise parallel verabreicht werden.

Die pharmazeutischen Zusammensetzungen oder das Arzneimittel umfasst insbesondere eine pharmakologische Substanz, die ein oder mehrere erfindungsgemäße Erkennungsmoleküle oder/und diese kodierende Nukleinsäuremoleküle in einer geeigneten Lösung oder Verabreichungsform enthält. Diese können entweder alleine mit den entsprechenden unter Arzneimitteln oder pharmazeutischen Zusammensetzungen beschriebenen Hilfsstoffen oder in Kombination mit einem oder mehreren Adjuvantien, beispielsweise QS-21, GPI-0100 oder andere Saponine, Wasser-Öl Emulsionen wie beispielsweise Montanide Adjuvantien, Polylysin, Polyargininverbindungen, DNA-Verbindungen wie beispielsweise CpG, Detox, bakterielle Vakzine wie beispielsweise Thyphusvakzine oder BCG-Vakzine, und/oder einem anderen geeigneten Stoff zur Wirkungsverstärkung verabreicht werden; vorzugsweise immunstimulatorische Moleküle, wie Interleukine, beispielsweise IL-2, IL-12, IL-4 und/oder Wachstumsfaktoren, beispielsweise GM-CSF. Diese werden in bekannten Methoden mit den erfindungsgemäßen

Erkennungsmolekülen gemischt und in einer geeigneten Formulierung und Dosierung verabreicht. Formulierungen, Dosierungen und geeignete Komponenten sind dem Fachmann bekannt.

5

Die pharmazeutische Zusammensetzung oder das Arzneimittel kann selbstverständlich auch eine Kombination von 2 oder mehreren der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen oder Arzneimittel sein, sowie eine Kombination mit anderen
 10 Arzneimitteln, Tumorstoffen oder Tumorbearbeitungen, wie beispielsweise Antikörpertherapien, Chemotherapien oder Radiotherapien, die auf eine geeignete Weise zeitlich gemeinsam oder getrennt verabreicht beziehungsweise angewandt werden. Herstellung der Arzneimittel oder pharmazeutischen
 15 Zusammensetzungen erfolgt nach an sich bekannten Methoden.

Die Arzneimittel oder pharmazeutischen Zusammensetzungen können insbesondere zur Behandlung von Core-1 positiven Tumorerkrankungen eingesetzt werden, wie beispielsweise
 20 Mammakarzinome, Zervixkarzinome, Ovarialkarzinome, Colonkarzinome, Gastrointestinalkarzinome, Pankreaskarzinome, Lungenkarzinome, Prostatakarzinome. Zu diesen Tumorerkrankungen können auch Core-1 und/oder Core-2 positive Tumorerkrankungen gehören. Die Behandlung geht beispielsweise
 25 gegen Primärtumoren, minimal residuale Tumorerkrankungen, Relapses und/oder Metastasen. Die Behandlung der Tumoren kann auch als adjuvante Behandlung erfolgen. Die Verwendung der Arzneimittel kann auch zur Prophylaxe von Core-1 positiven Tumorerkrankungen erfolgen. Die prophylaktische Anwendung
 30 zielt beispielsweise auf eine Prophylaxe des Tumors sowie von Metastasen. Die Tumormittel werden in einer geeigneten Form nach bekannten Methoden verabreicht. Eine bevorzugte Variante ist die Injektion beziehungsweise Verabreichung der Arzneimittel intravenös, lokal in Körperkavitäten,
 35 beispielsweise intraperitoneal, intrarektal,

intragastrointestinal, lokal beispielsweise direkt in den Tumor, Organe oder Lymphgefäße (intranodal), aber auch subkutan, intradermal oder auf der Haut, intramuskulär. Verabreichungsarten können bevorzugterweise auch kombiniert werden, wobei sie an verschiedenen Behandlungstagen oder an einem Behandlungstag verabreicht werden können. Dabei können erfindungsgemäß auch 2 oder mehrere der erfindungsgemäßen Arzneimittel oder pharmazeutischen Zusammensetzungen kombiniert werden oder eine oder mehrere erfindungsgemäße Arzneimittel mit ein oder mehreren Arzneimitteln oder Tumorerkrankungen, wie beispielsweise Antikörpertherapien, Chemotherapien oder Radiotherapien, die zeitlich gemeinsam oder getrennt verabreicht beziehungsweise angewandt werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels oder einer pharmazeutischen Zusammensetzung umfassend die Schritte der Herstellung von Erkennungsmolekülen und weiterhin umfassend den Schritt der Formulierung der erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle in pharmazeutisch verträglicher Form. Die hierfür bevorzugten erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle sind weiter oben als Ausführungsformen zur Behandlung von Tumorerkrankungen und Prophylaxe, sowie weiter unten unter in vivo Diagnostika näher beschrieben.

Die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle und durch das erfindungsgemäße Verfahren hergestellten Stoffe und Zusammensetzungen können demgemäß bevorzugt zur Prophylaxe, Diagnose, Verlaufskontrolle und/oder Behandlung von Tumorerkrankungen verwendet werden. Die Verwendung der Erkennungsmoleküle, der Vektoren und/oder des Arzneimittels oder der pharmazeutischen Zusammensetzung zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Krebserkrankungen, einschließlich Tumoren und Metastasen ist weiterhin bevorzugt.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Krebserkrankung oder der Tumor, die/der behandelt oder verhindert wird, ausgewählt aus der Gruppe von Krebserkrankungen oder Tumorerkrankungen des Hals-Nasen-Ohren-Bereichs, der Lunge, des Mediastinums, des Gastrointestinaltraktes, des Urogenitalsystems, des gynäkologischen Systems, der Brust, des endokrinen Systems, der Haut, Knochen- und Weichteilsarkomen, Mesotheliomen, Melanomen, Neoplasmen des zentralen Nervensystems, Krebserkrankungen oder Tumorerkrankungen im Kindesalter, Lymphomen, Leukämien, paraneoplastischen Syndromen, Metastasen ohne bekannten Primärtumor (CUP-Syndrom), peritonealen Karzinomastosen, Immunsuppression-bezogenen Malignitäten und/oder Tumor-Metastasen.

Insbesondere kann es sich bei den Tumoren um folgende Krebsarten handeln: Adenokarzinom der Brust, der Prostata und des Dickdarms; alle Formen von Lungenkrebs, der von den Bronchien ausgeht; Knochenmarkkrebs, das Melanom, das Hepatom, das Neuroblastom; das Papillom; das Apudom, das Choristom, das Branchiom; das maligne Karzinoid-Syndrom; die Karzinoid-Herzerkrankung; das Karzinom (z.B. Walker-Karzinom, Basalzellen-Karzinom, basosquamöses Karzinom, Brown-Pearce-Karzinom, duktales Karzinom, Ehrlich-Tumor, in situ-Karzinom, Krebs-2-Karzinom, Merkel-Zellen-Karzinom, Schleimkrebs, nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom, Haferzellen-Karzinom, papilläres Karzinom, szirrhöses Karzinom, bronchiolo-alveoläres Karzinom, Bronchiai-Karzinom, Plattenepithelkarzinom und Transitionalzell-Karzinom); histiocytische Funktionsstörung; Leukämie (z.B. in Zusammenhang mit B-Zellen-Leukämie, Gemischt-Zellen-Leukämie, Nullzellen-Leukämie, T-Zellen-Leukämie, chronische T-Zellen-Leukämie, HTLV-II-assoziierte Leukämie, akut lymphozytische Leukämie, chronisch-lymphozythische Leukämie, Mastzell-Leukämie und myeloische Leukämie); maligne Histiocytose, Hodgkin-Krankheit, non-Hodgkin-Lymphom, solitärer

Plasmazelltumor; Reticuloendotheliose, Chondroblastom;
 Chondrom, Chondrosarkom; Fibrom; Fibrosarkom; Riesenzell-
 Tumore; Histiocytom; Lipom; Liposarkom; Leukosarkom;
 Mesotheliom; Myxom; Myxosarkom; Osteom; Osteosarkom; Ewing-
 5 Sarkom; Synoviom; Adenofibrom; Adenolymphom; Karzinosarkom,
 Chordom, Craniopharyngiom, Dysgerminom, Hamartom; Mesenchymom;
 Mesonephrom, Myosarkom, Ameloblastom, Cementom; Odontom;
 Teratom; Thymom, Chorioblastom; Adenokarzinom, Adenom;
 Cholangiom; Cholesteatom; Cylindrom; Cystadenocarcinom,
 10 Cystadenom; Granulosazelltumor; Gynadroblastom; Hidradenom;
 Inselzelltumor; Leydig-Zelltumor; Papillom; Sertoli-Zell-
 Tumor, Thekazelltumor, Leiomyom; Leiomyosarkom; Myoblastom;
 Myom; Myosarkom; Rhabdomyom; Rhabdomyosarkom; Ependynom;
 Ganglioneurom, Gliom; Medulloblastom, Meningiom; Neurilemmom;
 15 Neuroblastom; Neuroepitheliom, Neurofibrom, Neurom,
 Paragangliom, nicht-chromaffines Paragangliom, Angiokeratom,
 angiolymphoide Hyperplasie mit Eosinophilie; sclerosierendes
 Angiom; Angiomatose; Glomangiom; Hemangioendotheliom;
 Hemangiom; Hemangiopericytom, Hemangiosarkom; Lymphangiom,
 20 Lymphangiomyom, Lymphangiosarkom; Pinealom; Cystosarkom
 phyllodes; Hemangiosarkom; Lymphangiosarkom; Myxosarkom,
 Ovarialkarzinom; Sarkom (z.B. Ewing-Sarkom, experimentell,
 Kaposi-Sarkom und Mastzell-Sarkom); Neoplasmen (z.B. Knochen-
 Neoplasmen, Brust-Neoplasmen, Neoplasmen des
 25 Verdauungssystems, colorektale Neoplasmen, Leber-Neoplasmen,
 Pankreas-Neoplasmen, Hirnanhang-Neoplasmen, Hoden-Neoplasmen,
 Orbita-Neoplasmen, Neoplasmen des Kopfes und Halses, des
 Zentralnervensystems, Neoplasmen des Hörorgans, des Beckens,
 des Atmungstrakts und des Urogenitaltrakts); Neurofibromatose
 30 und zervikale Plattenepitheldysplasie.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform ist die
 Krebserkrankung oder der Tumor, die/der behandelt oder
 verhindert wird, ausgewählt aus der Gruppe von
 35 Krebserkrankungen oder Tumorerkrankungen, die Zellen umfassen,

die das Core-1 in der erfindungsgemäßen Definition umfassen,
 ausgewählt aus der Gruppe: Tumoren des Hals-Nasen-Ohren-
 Bereichs umfassend Tumoren der inneren Nase, der
 Nasennebenhöhlen, des Nasopharynx, der Lippen, der Mundhöhle,
 5 des Oropharynx, des Larynx, des Hypopharynx, des Ohres, der
 Speicheldrüsen und Paragangliome, Tumoren der Lunge umfassend
 nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome, kleinzellige
 Bronchialkarzinome, Tumoren des Mediastinums, Tumoren des
 Gastrointestinaltraktes umfassend Tumoren des Ösophagus, des
 10 Magens, des Pankreas, der Leber, der Gallenblase und der
 Gallenwege, des Dünndarms, Kolon- und Rektumkarzinome und
 Analkarzinome, Urogenitaltumoren umfassend Tumoren der Nieren,
 der Harnleiter, der Blase, der Prostata, der Harnröhre, des
 Penis und der Hoden, gynäkologische Tumoren umfassend Tumoren
 15 des Zervix, der Vagina, der Vulva, Korpuskarzinom, maligne
 Trophoblastenerkrankung, Ovarialkarzinom, Tumoren des
 Eileiters (Tuba Fallopii), Tumoren der Bauchhöhle,
 Mammakarzinome, Tumoren endokriner Organe umfassend Tumoren
 der Schilddrüse, der Nebenschilddrüse, der Nebennierenrinde,
 20 endokrine Pankreastumoren, Karzinoidtumoren und
 Karzinoidsyndrom, multiple endokrine Neoplasien, Knochen- und
 Weichteilsarkome, Mesotheliome, Hauttumoren, Melanome
 umfassend kutane und intraokulare Melanome, Tumoren des
 zentralen Nervensystems, Tumoren im Kindesalter umfassend
 25 Retinoblastom, Wilms Tumor, Neurofibromatose, Neuroblastom,
 Ewing-Sarkom Tumorfamilie, Rhabdomyosarkom, Lymphome umfassend
 Non-Hodgkin-Lymphome, kutane T-Zell-Lymphome, primäre Lymphome
 des zentralen Nervensystems, Morbus Hodgkin, Leukämien
 umfassend akute Leukämien, chronische myeloische und
 30 lymphatische Leukämien, Plasmazell-Neoplasmen,
 myelodysplastische Syndrome, paraneoplastische Syndrome,
 Metastasen ohne bekannten Primärtumor (CUP-Syndrom),
 peritoneale Karzinomatose, Immunsuppression-bezogene
 Malignität umfassend AIDS-bezogene Malignitäten wie Kaposi-
 35 Sarkom, AIDS-assoziierte Lymphome, AIDS-assoziierte Lymphome

des zentralen Nervensystems, AIDS-assoziiierter Morbus Hodgkin und AIDS-assoziiierter anogenitale Tumoren, Transplantationsbezogene Malignitäten, metastasierte Tumoren umfassend Gehirnetastasen, Lungenmetastasen, Lebermetastasen, Knochenmetastasen, pleurale und perikardiale Metastasen und maligne Aszites.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform ist die Krebserkrankung oder der Tumor, die/der behandelt oder verhindert wird, ausgewählt aus der Gruppe umfassend Krebserkrankungen oder Tumorerkrankungen der Mammakarzinome, der Gastrointestinaltumore, einschließlich Kolonkarzinome, Magenkarzinome, Pankreaskarzinome, Dickdarmkrebs, Dünndarmkrebs, der Ovarialkarzinome, der Zervikalkarzinome, Lungenkrebs, Prostatakrebs, Nierenzellkarzinome und/oder Lebermetastasen.

Die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle können bei der Behandlung oder Prophylaxe von Tumorerkrankungen direkt eingesetzt werden oder mit zusätzlichen Effektorstrukturen gekoppelt werden. Unter „Effektorstrukturen“ versteht man erfindungsgemäß solche chemischen oder biochemischen Verbindungen, Moleküle oder Atome, die direkt oder indirekt eine Abtötung oder Schädigung, einschließlich beispielsweise Wachstumsverlangsamung oder Wachstumsinhibition von Tumorzellen bewirken. Hierzu gehören beispielsweise Radioisotope, Toxine, Cytostatika und andere Effektormoleküle wie beispielsweise Cytokine und Chemokine oder andere Strukturen, die selbst Effektoren darstellen oder an die Effektormoleküle gekoppelt werden, beispielsweise mit Toxinen oder Cytostatika beladene Liposomen, die erfindungsgemäße Erkennungsmoleküle tragen. Beim letzteren Beispiel der Liposomen sind insbesondere auch solche Effektorstrukturen gemeint, die neben dem Erkennungsmolekül für die Tumorspezifität auch solche Moleküle tragen, die für eine

Aufnahme der Effektorstrukturen oder Teile davon in die Zellen verantwortlich sind, wie beispielsweise Antikörper gegen Rezeptoren, die eine Rezeptor-vermittelte Endozytose bewirken. Vorzugsweise umfassen die Erkennungsmoleküle in diesen Fällen eine Transmembrandomäne, die ihnen eine Insertion in die Liposomenmembran erlaubt oder in einer anderen bevorzugten Ausführungsform werden die Erkennungsmoleküle chemisch auf die Liposomenoberfläche gekoppelt. Die hierfür verwendeten Techniken sind dem Fachmann bekannt, einschließlich der Herstellung der Liposomen. Auch die Verbindung der Erkennungsmoleküle mit den anderen Effektorstrukturen erfolgt nach an sich bekannten Methoden. Die Kopplungen können dabei wie bereits oben ausgeführt beispielsweise direkt durch kovalente oder nicht-kovalente Beladung erfolgen, durch chemische Kopplung, wobei ein zusätzliches chemisches oder biologisches Molekül notwendig sein kann, beispielsweise ein Chelator oder ein Linker, oder in Form von Fusionsproteinen oder -peptiden durch Fusion. Eingesetzt werden die Erkennungsmoleküle bei der Behandlung von Tumorerkrankungen mit Core-1 tragenden Tumoren, und/oder für eine Untergruppe an erfindungsgemäßen Erkennungsmolekülen, die weiter oben über ihre Spezifität für Core-1 und Core-2 beschrieben sind, Core-2 und/oder Core-1 tragenden Tumorzellen oder zur Prophylaxe, die beispielsweise die Ausbildung von primären Tumoren oder Metastasen verhindert. Bevorzugtes Ziel ist dabei die Behandlung der minimalen residualen Erkrankung und von Metastasen. Eine weitere bevorzugte Anwendung ist dabei die Inhibition der Lebermetastasierung von Core-1 und/oder Core-2 positiven Tumorzellen. Die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle werden dabei in einer geeigneten Formulierung einmalig oder wiederholt in geeigneten zeitlichen Abständen und Dosen verabreicht.

Im Folgenden und davor versteht man im Sinne der Erfindung unter dem Core-1 Antigen auch Core-1 und/oder Core-2 und unter

Core-1 positiven Zellen oder Tumorzellen und/oder -geweben auch Core-1 und/oder Core-2 positive Zellen oder Tumorzellen und/oder -gewebe.

- 5 In einer bevorzugten Ausführungsform werden die erfindungsgemäßen oben beschriebenen radioaktiven Erkennungsmoleküle mit einer Applikation von nicht markierten erfindungsgemäßen Core-1 spezifischen Erkennungsmolekülen kombiniert. Dies dient der Verbesserung des Hintergrundes und
10 damit einer spezifischeren Bindung an den Tumor, indem potentielle Core-1 tragende Moleküle im Blut abgesättigt werden. Bevorzugt werden dabei IgM abgeleitete Erkennungsmoleküle verwendet, beispielsweise der in den Beispielen beschriebene cIgM oder die humanisierte Form davon,
15 da diese vor allem an Core-1 Antigen im Blut binden und damit den Hintergrund und die Serumbelastung mit Radioaktivität erniedrigen und das relative Tumortargeting erhöhen, während aufgrund der Größe der Moleküle ein Eindringen in Gewebe und Tumoren limitiert ist. Die hierfür verwendeten Verfahren und
20 Technologien sind dem Fachmann bekannt, ebenfalls kann der Fachmann eine geeignete Dosis, Formulierungen, Applikationsroute und Zeitpunkt der Gabe der nicht-markierten Erkennungsmoleküle erstellen.
- 25 Bevorzugt ist weiterhin die Verwendung von viralen Vektoren zur gentherapeutischen Anwendung, bei der insbesondere die Oberfläche der Viren erfindungsgemäße Erkennungsmoleküle tragen.
- 30 Die Erfindung betrifft weiterhin Verfahren unter Verwendung der erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle, die es erlauben, aus einem großen Pool unterschiedlicher Moleküle Core-1 tragende Moleküle zu identifizieren und/oder zu gewinnen, die für eine Anwendung in der Tumorbehandlung, Tumorphylaxe und
35 Tumordiagnose vorteilhaft verwendet werden können. Unter Core-

1 tragenden Molekülen versteht man erfindungsgemäß Moleküle, die Core-1 und/oder Core-2 Strukturen tragen und spezifisch von den erfindungsgemäßen Erkennungsmolekülen gebunden werden. Erfindungsgemäß sind Core-1 tragende Moleküle Glykoproteine, Glykopeptide und/oder Glykolipide sowie auch Zellen oder andere Trägersubstanzen, wie beispielsweise Viren, Bakterien, Teile von Zellen, wie beispielsweise Exosomen oder Zelllysate, oder Liposomen, die ein oder mehrere Core-1 Strukturen enthalten. Die Core-1 tragenden Moleküle können aus Zellen oder Zelllinien, aus Kulturüberständen, aus Tumorgewebe, Tumorzellen oder Körperflüssigkeiten, wie Blut, Blutserum, Lymphe, Urin, Spinalflüssigkeit oder Sperma angereichert oder isoliert werden.

15 Die zuvor eingeführten Definitionen der Begriffe sind für die Begriffe in den nachfolgend beschriebenen Verfahren mutatis mutandis anwendbar.

Core-1 tragende Moleküle werden in einem erfindungsgemäßen Verfahren durch Bindung an die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Core-1 spezifischen Erkennungsmoleküle identifiziert und/ oder isoliert und gewonnen. Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren können die oben beschriebenen Core-1 tragenden Moleküle aus Körperflüssigkeiten oder aus Überständen von Zellkulturen durch eine Affinitätschromatographie gewonnen werden. Dabei können weitere Reinigungs- und/oder Konzentrierungsschritte nach an sich bekannten Methoden mit einem oder mehreren Affinitätschromatographieschritten kombiniert werden. Ebenso können tumorassoziierte Core-1 tragende Moleküle aus Tumorzellen, Tumorgeweben oder Tumorzelllinien gewonnen werden, indem ein geeigneter Schritt nach an sich bekannten Methoden vorgeschaltet wird, der es erlaubt, die zellassoziierten Core-1 tragenden Moleküle für die

Affinitätsreinigung zugänglich zu machen, beispielsweise durch Solubilisierung mit geeigneten Detergenzien oder durch Abspaltung durch Proteolyse oder durch Zelllyse.

5 In einem weiteren erfindungsgemäßen Verfahren werden Core-1 tragende Moleküle oder Zellen aus Geweben gewonnen. Hierzu wird das Gewebe nach an sich bekannten Methoden aufgeschlossen, um die Core-1 tragenden Moleküle oder Zellen zugänglich zu machen, beispielsweise durch proteolytische oder
10 mechanische Methoden. Dem Fachmann sind diese Verfahren bekannt.

Wie oben ausgeführt werden auch Core-1 positive Zellen oder Zelllinien unter Verwendung der Core-1 spezifischen
15 Erkennungsmoleküle isoliert oder angereichert und von solchen Zellen, die keine oder geringe Mengen an Core-1 Strukturen tragen, getrennt. Unter dem Begriff "Isolierung oder Anreicherung der Zellen" sind alle Maßnahmen zur Separierung von Zellen zu verstehen, die durch das Tragen von Core-1
20 Strukturen einen Komplex mit den erfindungsgemäßen Erkennungsmolekülen gebildet haben. Dem Fachmann sind diese Verfahren bekannt. Vorzugsweise wird hierfür die FACS oder die MACS Methode eingesetzt. Beispielsweise erfolgt die Anreicherung durch Bindung von erfindungsgemäßen
25 Erkennungsmolekülen an die Core-1 Struktur auf der Zelloberfläche und anschließender Selektion der so markierten Zellen durch Bindung an Trägermaterialien, die spezifisch mit dem Erkennungsmolekül interagieren, beispielsweise anti-Maus IgM Antikörper gekoppelt an Magnetbeads (MACS-Sortierung).
30 Außerdem können die Core-1 spezifischen Erkennungsmoleküle selbst kovalent an einen Träger gekoppelt sein. Ein weiteres Beispiel ist die Gewinnung mit Hilfe eines FACS-Sorters, der Zellen, die die Erkennungsmoleküle tragen, die fluoreszenzmarkiert wurden, sortiert. Beide Methoden sind dem
35 Fachmann bekannt. Diese so angereicherten Core-1 positiven

Zellen können für die Herstellung von Vakzinen verwendet werden, beispielsweise zur Beladung von Dendritischen Zellen oder direkt als Tumorzelllysate in einer Vakzinen Zusammensetzung. Die vorhergehende Anreicherung von Core-1 positiven Zellen soll zu einer höheren Tumorspezifität der Vakzinierung führen. Dem Fachmann sind diese Verfahren bekannt.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin Verfahren zur Herstellung eines Diagnostikums umfassend die Schritte des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung der erfindungsgemäßen Core-1 spezifischen Erkennungsmoleküle und weiterhin umfassend den Schritt der Formulierung der Erkennungsmoleküle in einer diagnostisch verwendbaren Form

Unter dem Begriff "Diagnostikum" sind erfindungsgemäß Stoffe und Zubereitungen aus Stoffen definiert, die dazu bestimmt sind, durch Anwendung am oder im menschlichen Körper oder Teilen davon Krankheiten, Leiden, Körperschäden oder krankhafte Beschwerden zu erkennen. Als Teile des menschlichen Körpers sind vorzugsweise Körperflüssigkeiten, wie Blut, Blutserum, Lymphe, Urin, Spinalflüssigkeit oder Sperma, oder Gewebebiopsien oder -proben zu verstehen.

Die Formulierung des Diagnostikums umfasst vorzugsweise die Modifikation der hergestellten Erkennungsmoleküle mit Substanzen, die einen Nachweis des Antigens Core-1, in bestimmten Ausführungsformen, die von der Feinspezifität des erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküls abhängen, definitionsgemäß auch das Antigen Core-2, erlauben. Geeignete Substanzen sind im Stand der Technik bekannt. Ausgehend von der Wahl der Substanz ist der Fachmann in der Lage, geeignete Maßnahmen zur Formulierung des Diagnostikums einzusetzen.

Für die Diagnostik können erfindungsgemäß auch Substanzen nach an sich bekannten Methoden an die Erkennungsmoleküle gekoppelt werden, die einen Nachweis der Core-1 Antigene und/oder deren Trägermoleküle und/oder -zellen erleichtern, beispielsweise durch Biotinylierung, Fluoreszenzmarkierung, radioaktive Markierung oder Enzymkopplung der Erkennungsmoleküle.

In einem weiteren Verfahren zur Tumordiagnostik und Prognose werden erfindungsgemäße Erkennungsmoleküle verwendet, die Core-1 Antigene und/oder deren Trägermoleküle im Serum von Menschen erkennen. Die Bestimmung erfolgt bevorzugt qualitativ, quantitativ und/oder in zeitlich relativen Quantitäten nach an sich bekannten Methoden. Die gleichen Verfahren werden erfindungsgemäß auch zur Verlaufskontrolle von Tumorerkrankungen und zur Kontrolle von Behandlungsverläufen einschließlich des Monitorings von Immunantworten und zur Kontrolle und Dosierung von Tumorbehandlungen eingesetzt. Die in den Verfahren verwendeten Methoden sind an sich bekannt, beispielsweise ELISA, Westernblot, FACS (Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung), MACS (Magnetvermittelte Zellsortierung), ADCC (Antikörpervermittelte Zellzytotoxizität), CDC (Komplement vermittelte Zytotoxizität), Immuncytochemie und Immunhistochemie.

In den bevorzugten erfindungsgemäßen Verfahren zur Tumordiagnostik und Prognose werden erfindungsgemäße Core-1 spezifische Erkennungsmoleküle in an sich bekannten Verfahren eingesetzt, um das Antigen Core-1 im Serum oder in Gewebspräparaten nachzuweisen. Dabei wird das Antigen Core-1 auf Trägermolekülen, in Immunkomplexen auf Trägermolekülen vorliegendes Core-1 und/oder auf Zellen gebundenes Core-1 nachgewiesen und das Vorhandensein des Core-1 Antigens und/oder der Core-1 tragenden Moleküle qualitativ, quantitativ und/oder in relativen Quantitäten nach an sich bekannten Methoden bestimmt. Die gleichen Verfahren werden erfin-

5 dungsgemäß auch zur Verlaufskontrolle von Tumorerkrankungen und zur Kontrolle von Behandlungsverläufen eingesetzt. Die in den Verfahren verwendeten Methoden sind an sich bekannt, beispielsweise ELISA, Western-Blot, FACS (Fluoreszenz-

10 aktivierte Zellsortierung), MACS (Magnetvermittelte Zellsortierung), ADCC (Antikörpervermittelte Zellzytotoxizität), CDC (Komplement vermittelte Zytotoxizität), Immuncytochemie und Immunhistochemie.

10 Eine bevorzugte Ausführungsform ist ein Gewebsschnelltest, bei dem in einem immunhistologischen Verfahren die Gewebeproben mit fluoreszenzmarkierten erfindungsgemäßen Erkennungsmolekülen gefärbt werden. In einem weiter bevorzugten Verfahren wird das erfindungsgemäße Erkennungsmolekül,

15 bevorzugt ein Antikörper des Isotyps IgM, mit einem weiteren Antikörper, der spezifisch das Antigen MUC1 erkennt, bevorzugt Isotyp IgG1, kombiniert. Der Vorteil dabei ist, dass beispielsweise für die Diagnostik von gastrointestinalen Karzinomen (z.B. Colorektale Karzinome und Magenkarzinome)

20 diese in einem frühen Stadium erkannt und gleichzeitig eine Prognose bezüglich des Krankheitsverlaufes und/oder der Lebermetastasierungsgefahr gegeben werden kann, wobei ein höheres Niveau an Core-1 Antigen eine schlechtere Verlaufsprognose und eine um das mehrfach höhere

25 Wahrscheinlichkeit der Lebermetastasierung bedeutet. In einer weiter bevorzugten Ausführungsform sind die Antikörper und Erkennungsmoleküle direkt mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen, beispielsweise Cy3 und Cy5 oder Cy3 und FITC, markiert. In einer Ausführungsform, in der eine

30 Signalverstärkung vorteilhaft ist, werden die Antikörper und/oder Erkennungsmoleküle durch markierte sekundäre Antikörper oder das Biotin-Streptavidin verstärkt. Dabei ist es vorteilhaft, unterschiedliche Isotypen und/oder Speziessequenzen im konstanten Teil der Antikörper zu

35 verwenden. Die hierbei verwendeten Technologien und Methoden,

beispielsweise der Markierung und der Immunhistologie, sowohl die Wahl der geeigneten Formate der Erkennungsmoleküle sind dem Fachmann bekannt. Das beschriebene diagnostische Verfahren ist nicht auf gastrointestinale Tumoren beschränkt, sondern
5 anwendbar für alle das Antigen Core-1 tragende Tumorerkrankungen.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform wird ein serologischer Test durchgeführt, bei dem als Verfahren ein
10 Sandwich-ELISA verwendet wird. Dieser besteht aus einem Fängerantikörper, der Trägermoleküle des Core-1 Antigens aus dem Serum an eine feste Phase bindet, und einem Nachweisantikörper, hierunter fallen erfindungsgemäß auch andere erfindungsgemäße Erkennungsmoleküle, die das Core-1
15 Antigen erkennen. Damit kann unterschieden werden, welches Trägermolekül das Core-1 trägt. In einer bevorzugten Form kann damit auf den Ursprung des Primärtumors Rückschlüsse gezogen werden. Als Fängerantikörper können verschiedene Antikörper dienen, die Glykoproteine erkennen, die O-Glykosylierungen
20 tragen. Eine bevorzugte Ausführungsform verwendet Antikörper gegen das epitheliale Muzin MUC1 als Fängerantikörper, das häufig ein Träger des Core-1 im Tumorfall ist. In einer weiteren Ausführungsform werden alle Antigene im Blut bestimmt, die das Core-1 Antigen tragen. Dies ist dadurch möglich, dass
25 das Core-1 Antigen in der Regel in mehreren Kopien pro Trägermolekül vorkommt. Hierbei wird erfindungsgemäß ein erfindungsgemäßes Core-1 spezifisches Erkennungsmolekül als Fängerantikörper verwendet und ein markiertes erfindungsgemäßes Core-1 spezifisches Erkennungsmolekül als
30 Nachweisantikörper, wobei die Erkennungsmoleküle keine Antikörper sein müssen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein IgM als Erkennungsmolekül mindestens als Fänger- oder Nachweisantikörper verwendet. In einer weiter bevorzugten Ausführungsform wird der Nachweisantikörper mit Biotin
35 markiert und das System über Streptavidin in Kombination mit

einem geeigneten Nachweisverfahren nachgewiesen. Ein geeignetes Nachweisverfahren sind beispielsweise POD Markierungen oder Fluoreszenzmarkierungen des Streptavidins.

5 In einer weiter bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden für einen serologischen Tumortest die Bestimmung des Core-1 Antigens, wie zuvor beschrieben, mit der Bestimmung anderer serologischer Tumormarker kombiniert, beispielsweise PSA, CEA oder AFP. Eine hierbei bevorzugte Ausführungsform ist
10 die Bestimmung des MUC1 und des Core-1 Antigens. In einer bevorzugten Ausführungsform wird hierbei das MUC1 mit Hilfe eines MUC1 spezifischen Antikörpers aus dem Serum an eine feste Phase immobilisiert und mit einem zweiten anti-MUC1 spezifischen Antikörper, bevorzugt solche, die die DTR-Region
15 in einer glykosylierten Form verbessert erkennen, als Nachweisantikörper nachgewiesen und das Core-1 Antigen auf dem mit Hilfe eines anti-MUC1 Fängerantikörpers immobilisierten MUC1 mit einem erfindungsgemäßen Erkennungsmolekül nachgewiesen. Dieser diagnostische Test verbindet eine
20 Früherkennung mit einer prognostischen Aussage über den Krankheitsverlauf und/oder der Lebermetastasierungswahrscheinlichkeit. Die hierbei verwendeten Technologien, beispielsweise der Markierung und der Serologie, einschließlich der Nachweismethoden, sind dem Fachmann
25 bekannt. Die beschriebenen diagnostischen Verfahren sind nicht auf gastrointestinale Tumoren beschränkt, sondern anwendbar für alle das Antigen Core-1 tragende Tumoren. Die beschriebenen serologischen Tests dienen der Diagnose, des Monitorings des Verlaufs der Tumorerkrankung und der Prognose
30 von Core-1 Antigen-positiven Tumoren.

In einem weiteren erfindungsgemäßen Verfahren werden die erfindungsgemäßen Core-1-spezifischen Erkennungsmoleküle zu einer in vivo Diagnostik verwendet. Hierfür werden die
35 Erkennungsmoleküle mit geeigneten an sich bekannten Verfahren

markiert und somit für an sich bekannte bildgebende Verfahren am Menschen zugänglich gemacht, beispielsweise Radioimmundiagnostik, PET-Scan Verfahren oder Immunofluoreszenzendoskopie, beispielsweise durch Kopplung und/oder Beladung mit entsprechenden Molekülen, beispielsweise radioaktiven Isotope, beispielsweise das Indium, oder Fluoreszenzfarbstoffe, beispielsweise dem Cy3, Cy2, Cy5 oder FITC. In einer bevorzugten Ausführungsform werden erfindungsgemäße Multibodies mit einem geeigneten Chelator (beispielsweise DOTA oder DTPA) kovalent gekoppelt und mit Indium-111 beladen und zur in vivo Diagnostik eingesetzt. Diese werden in einer bevorzugten Ausführungsform intravenös in einer für das Individuum geeigneten Dosis verabreicht und die Lokalisation des Core-1 Antigens und eines potentiellen Tumors nach an sich bekannten Verfahren gemessen. Die hierfür verwendeten Verfahren und Technologien, einschließlich der bildgebenden Verfahren, sind dem Fachmann bekannt, ebenfalls kann der Fachmann eine geeignete Dosis und Formulierungen erstellen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden Immunglobuline, bevorzugt IgM und IgG, wie oben beschrieben und in den Beispielen näher ausgeführt, radioaktiv-markiert, beispielsweise mit Indium-111, und lokal in den Tumor oder in den Tumor versorgende oder entsorgende Blutgefäße gegeben. Dies dient in einer Ausführungsform zur Bestimmung der Größe des Tumors und in einer weiteren Ausführungsform der Bestimmung befallener Lymphknoten. Die hierfür verwendeten Verfahren und Technologien sind dem Fachmann bekannt, ebenfalls kann der Fachmann eine geeignete Dosis und Formulierungen erstellen.

In einer weiteren Ausführungsform werden die erfindungsgemäßen radioaktiv-markierten Erkennungsmoleküle auch über andere Applikationsrouten verabreicht. Dabei bevorzugte Routen sind

intraperitoneal, intranodal oder intrarectal bzw. intragastrointestinal. Intraperitoneal ist dabei besonders vorteilhaft zur Bestimmung von Tumoren, die über das Peritoneum zugänglich sind und/oder in dieses metastasieren, beispielsweise Ovarialkarzinome und bestimmte gastrointestinale Karzinome. Intrarectale bzw. intragastrointestinale Verabreichung ist vorteilhaft für bestimmte gastrointestinale Tumoren und deren Lokalisation und Größenbestimmung. Intranodal kann in bestimmten Fällen dafür verwendet werden einzelne Lymphknoten direkt zu infiltrieren.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die erfindungsgemäßen oben beschriebenen radioaktiven Erkennungsmoleküle für in vivo Diagnostika mit einer Applikation von nicht markierten erfindungsgemäßen Core-1 spezifischen Erkennungsmolekülen kombiniert. Dies dient der Verbesserung des Hintergrundes. Bevorzugt werden dabei IgM abgeleitete Erkennungsmoleküle verwendet, da diese vor allem an Core-1 Antigen im Blut binden und damit den Hintergrund deutlich erniedrigen, während aufgrund der Größe der Moleküle ein Eindringen in Gewebe und Tumoren limitiert ist. Die hierfür verwendeten Verfahren und Technologien sind dem Fachmann bekannt, ebenfalls kann der Fachmann eine geeignete Dosis, Formulierungen, Applikationsroute und Zeitpunkt der Gabe der nicht-markierten Erkennungsmoleküle erstellen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden erfindungsgemäße Erkennungsmoleküle, bevorzugt Immunglobuline, Multibodies oder Antikörperfragmente, weiter bevorzugt IgM, IgG und Multibodies, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und in vivo verabreicht. Bevorzugte Applikationsrouten sind hierbei intrarectal, intragastrointestinal, intraperitoneal, intravenös und in zuführende oder abführende Blutgefäße. Eine besonders bevorzugte Ausführungsform dient der Lokalisation gastrointestinaler Karzinome, die durch eine Fluoreszenz-

endoskopie nach Applikation der fluoreszenzmarkierten Erkennungsmoleküle durchgeführt wird. In einer weiter bevorzugten Ausführungsform wird ein erfindungsgemäßes Erkennungsmolekül mit mindestens einem Antikörper gegen ein weiteres Tumorantigen kombiniert, bevorzugt anti-MUC1 Antikörper. Bevorzugt werden dabei unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, die eine Unterscheidung der Erkennungsmoleküle und Antikörper erlauben, womit eine prognostische Aussage mit einer Früherkennung und einer größeren Anzahl an Fällen kombiniert wird. Bevorzugte Fluoreszenzfarbstoffe sind solche mit geringer Hintergrundfluoreszenz, die dem Fachmann bekannt sind. Die hierfür verwendeten Verfahren und Technologien, einschließlich der bildgebenden Verfahren, beispielsweise der Fluoreszenz-Endoskopie, sind dem Fachmann bekannt, ebenfalls kann der Fachmann eine geeignete Dosis, Formulierungen, Applikationsroute und Zeitpunkt der Gabe der nicht-markierten Erkennungsmoleküle erstellen.

Die Erfindung weist mehrere Vorteile auf: Die erfindungsgemäßen Core-1 spezifischen Erkennungsmoleküle erkennen Karzinomarten spezifisch, wodurch sie mit Vorteil bei vielen Tumorpatienten verschiedener Indikation zu einer Diagnose und/oder Therapie verwendet werden können. Darüber hinaus binden die Erkennungsmoleküle vorteilhafterweise praktisch nicht auf normalen Geweben. Dies ist gegenüber den bekannten Tumormarkern ein besonderer Vorteil und eine herausragende Eigenschaft der erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle. Vorteilhaft ist weiterhin, daß die Erkennungsmoleküle das Core-1 Antigen Träger-unabhängig erkennen. Ein besonderer Vorteil der erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle ist die hohe Spezifität für das Tumorgewebe. Dies ist insbesondere in der hohen Spezifität für definite Kohlenhydrat-Antigene begründet. Bei einer unspezifischen Erkennung anderer Kohlenhydratstrukturen würde

sich nämlich die Gefahr der unspezifischen Erkennung von Nicht-Tumorgewebe erhöhen. Weiterhin weisen die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle eine hohe Affinität auf. Hierdurch ist insbesondere die Möglichkeit gegeben, geringervalente Fragmente zu konstruieren, wie IgG und Multibodies. Die Möglichkeit dieser verschiedenen Formate ist vorteilhaft für die Entwicklung von Therapeutika. Die Core-1 und/oder Core-2 Struktur an der Zelloberfläche erhöht die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von Metastasen, beispielsweise von Lebermetastasen; durch die Blockierung der Core-1 und/oder Core-2 Struktur mit Erkennungsmolekülen wird die Metastasenbildung reduziert bzw. inhibiert.

Im folgenden soll die Erfindung anhand von Beispielen näher erläutert werden, ohne auf diese Beispiele beschränkt zu sein.

Beispiele

1. Herstellung von Core-1 spezifischen Multibodies mit kurzen Linkern

Multibodies mit den Sequenzen SEQ ID NO. 96 bis 106 wurden durch Verkürzung oder Deletion des Linkers zwischen der V_H und der V_L des single chain Antikörpers mit der Sequenz SEQ ID NO. 95 gebildet (Abb. 1a). Hierfür wurden die V_H und die V_L mit spezifischen Primern so amplifiziert, daß 22 Nukleotide am 3'-Ende der V_H und am 5'-Ende der V_L einen komplementären Bereich ausbilden (Abb. 1b, PCR I und PCR II), und anschließend die beiden PCR-Fragmente nach Aufreinigung in einer SOE-PCR miteinander verknüpft (Abb. 1b, PCR III). Zum Schluß wurde das PCR-Fragment über NcoI/NotI in einen prokaryontischen Expressionsvektor kloniert. Dieser Vektor enthält den lacZ Promotor, eine Ribosomenbindungsstelle (RBS), das M13 origin, die pelB Signalsequenz zur Sekretion ins Periplasma, ein Ampicillin-Resistenzgen und eine Klonierungskassette, um an

das C-terminale Ende des scFv mit ein Hexa-Histidin-Tag zur effizienten Aufreinigung und ein c-myc-Tag zu koppeln (Abb. 2).

2. Bakterielle Expression und Aufreinigung der Core-1 spezifischen Multibodies

Die Antikörperfragmente aus Beispiel 1 wurden in *Escherichia coli* exprimiert und aufgereinigt. Hierfür wurde das entsprechende Plasmid durch Elektroporation in elektrokompente *E.coli* transformiert und über Nacht in 2xTY Medium (10 g Hefeextrakt, 16 g Trypton, 5 g NaCl per L) mit 100 µg/mL Ampicillin kultiviert. Diese Kultur wurde 1:100 mit 2xTY Medium, dem 100 µg/ml Ampicillin und 0,5% Glukose zugesetzt wurde, verdünnt und bei 37°C inkubiert, bis eine OD_{600 nm} von ca. 0,6 erreicht war. Dann wurde der Kultur zur Induktion 1 mM IPTG zugesetzt und diese bei 25°C weitere 5 h inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 4000xg für 20 min geerntet, das Zellpellet in TES Puffer (30 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20% Saccharose, 1 mM EDTA) resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 5 mM MgSO₄ zugefügt und die Suspension für weitere 20 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation bei 4000 x g für 60 min wurde dann die Periplasmafraktion gewonnen und über Nacht bei 4°C gegen Bindungspuffer (50 mM Phosphatpuffer, pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol) dialysiert. Die in der Periplasmafraktion enthaltenen Antikörperfragmente wurden unter Verwendung des C-terminalen His-Tags durch Metallionen-Affinitäts-chromatographie (HiTrap Chelating HP, Amersham Pharmacia Biotech) aufgereinigt. Dafür wurde die dialysierte Fraktion auf die vorher mit Bindungspuffer äquilibrierte Säule gegeben und mit Waschpuffer (50 mM Phosphatpuffer, pH 8.0, 300 mM NaCl, 30 mM Imidazol) die nicht bindenden Proteine von der Säule gewaschen. Anschließend wurden die Antikörperfragmente mit Elutionspuffer (50 mM Phosphatpuffer, pH 8.0, 300 mM NaCl,

300 mM Imidazol) eluiert. Dieses Aufreinigungsprotokoll wurde für alle Core-1 spezifischen Antikörperfragmente mit Hexa-Histidin-Tag verwendet, beispielsweise den humanisierten single chain Antikörpern aus Beispiel 6.

3. Analyse der Core-1 spezifischen Multibodies im scFv Format mit unterschiedlicher Linkerlänge im ELISA

Multibodies mit den Aminosäuresequenzen SEQ ID NO. 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 103, 104 und 105 wurden wie oben beschrieben in E.coli exprimiert und die Periplasmafraktionen gewonnen. Als Antigen für den ELISA Test wurde Asialoglykophorin (Sigma), ein Core-1 tragendes Glykoprotein, eingesetzt. Aus der Stammlösungen (1mg in 1ml Bi-dist. H₂O), die portioniert bei -20°C aufbewahrt werden, wurde eine Verdünnung von 5 µg/ml in PBS hergestellt. Davon wurden 50 µl/well in eine Mikrotiterplatte (NUNC-ON-TC Microwell 96 F) pipettiert und die Testplatte über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Testplatte mit PBS/0,2% Tween 3x gewaschen. Anschließend wurden mit 2% BSA in PBS unspezifische Bindungsstellen blockiert und 50 µl der jeweiligen mit PBS/1% BSA in verschiedenen Verdünnungsschritten verdünnten Fraktionen aufgetragen und 2 h bei 37°C inkubiert. Nach drei Waschschritten mit PBS/0,2% Tween wurden zum Nachweis der spezifisch gebundenen Antikörperkonstrukte als Zweit-Antikörper Peroxidase-gekoppelter anti-His Tag-Antikörper eingesetzt. Zum Nachweis des gebundenen sekundären Antikörpers erfolgte eine Farbreaktion mit TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine). Nach 15 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 2,5N H₂SO₄ abgestoppt. Die Messung erfolgte mit einem Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450nm im Dual-mode gegen einen Referenzfilter 630nm. Das Ergebnis ist in Abbildung 3 dargestellt. Eine schrittweise Linkerverkürzung führt zu einer Erhöhung der Bindung an Asialoglykophorin. Die besten Bindungseigenschaften zeigen die Varianten mit der SEQ

ID NO. 104 und 105. Diese multivalenten Konstrukte im Dia/Triabody Format sind bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung und sind aufgrund verbesserter pharmakokinetischer Eigenschaften für die Tumorthherapie von Vorteil.

4. Klonierung der Vektoren zur Expression chimärer Core-1 spezifischer IgG und IgM Antikörper

Das NcoI/XhoI DNA Fragment aus dem scFv Vektor, das für die V_H kodiert (Abb. 4), wurde in den NcoI/SalI geschnittenen BS-Leader Vektor kloniert. Der BS-Leader Vektor enthält eine Klonierungskassette zur Einführung der T-Zellrezeptor Signalpeptidsequenz an das 5'-Ende sowie einer Splice-Donor-Sequenz an das 3'-Ende der Sequenzen der variablen Domänen (Abb. 4). Die V_L-Sequenz des entsprechenden Antikörpers wurde mit spezifischen Primern zur Einführung der NcoI-Schnittstelle am 5'-Ende und der NheI-Schnittstelle am 3'-Ende in der PCR unter Verwendung der scFv Sequenz als Templat amplifiziert und nach NcoI/NheI Verdau in den gleich verdauten BS-Leader Vektor kloniert. Danach wurde jeweils das HindIII/BamHI Fragment aus dem BS-Leader Vektor in den entsprechenden eukaryontischen Expressionsvektor kloniert. Diese Vektoren (pEFpuroC γ 1V_H, pEFpuroC μ V_H und pEFneoC κ V_L) enthalten den EF-1 α -Promotor und den HCMV-Enhancer, das SV40-origin, das BGH-Polyadenylierungssignal, das Puromycin-Resistenzgen im Vektor für die schwere Kette und das Neomycin-Resistenzgen oder das Dehydrofolatreduktase-Gen im Vektor für die leichte Kette sowie die genomischen Sequenzen der humanen konstanten γ 1 Region oder μ Region für die schwere Kette bzw. der humanen konstanten κ Region für die leichte Kette (Primer zur Amplifizierung aus genomischer humaner DNA und Vektorkarte siehe Abb. 4).

5. Eukaryontische Expression Core-1 spezifischer chimärer IgG und IgM Antikörper in CHO Zellen und deren Aufreinigung

Zur Expression der chimären Antikörper cIgG-Karo4 bestehend aus den Sequenzen SEQ ID NO. 111 und 113 und cIgM-Karo4 bestehend aus den Sequenzen SEQ ID NO. 112 und 113 wurden CHOdhfr- Zellen (ATCC-Nr. CRL-9096) mit einem Gemisch der Vektoren für die schwere und die leichte Kette (1:3) durch Elektroporation (10^6 Zellen/ml, 500 V, 50 μ s) cotransfiziert und in Selektionsmedium (CHO-S-SFM II Medium (Life Technologies), HT Supplement (Biochrom), 400 μ g/ml G418, 5 μ g/ml Puromycin) 2 Wochen kultiviert. Nach Einzelzellklonierung in einer 96-Loch-Platte wurden die Überstände im ELISA (Asialoglykophorin als Antigen, anti human Fc γ 1- POD gekoppelt bzw. anti human Fc5 μ - POD gekoppelt (Dianova) als Sekundärantikörper) getestet und der Klon mit der höchsten Antikörperproduktionsrate selektioniert (ca. 0,5 μ g/ 10^6 Zellen/24 h).

Zur Antikörperproduktion wurden die stabil transfizierten, den chimären IgG bzw. IgM sekretierenden CHO Zellen in Spinnerflaschen in CHO-S-SFM II Medium, ergänzt durch HT Supplement, kultiviert, bis eine Zelldichte von ca. 1×10^6 Zellen/ml erreicht war. Nach Abtrennung der Zellen vom Zellkulturüberstand durch Zentrifugation (400xg, 15 min) wurde der chimäre Antikörper unter Verwendung einer Protein A - Säule (HiTrap rProtein A FF, Amersham Pharmacia Biotech) für den chimären IgG bzw. einer anti human Fc5 μ - Antikörper Affinitätssäule aufgereinigt. Die durch pH-Sprung eluierte gereinigte Antikörperfraktion wurde unter Verwendung von Centriprep-Zentrifugenröhrchen (cut off 50 kDa, Millipore) in PBS umgepuffert und aufkonzentriert.

6. Angleichung der Sequenz der Core-1 spezifischen Antikörpersequenzen an humane Keimbahnsequenzen

Für die Angleichung der Core-1 bindenden Antikörpersequenzen an humane Sequenzen wurde in der Datenbank humaner Keimbahnsequenzen nach homologen Sequenzen gesucht und unter Verwendung der humanen Consensus-Sequenzen und den Erkenntnissen der kanonischen Struktur humaner Antikörper wurden humanisierte Core-1-bindende Sequenzen entwickelt. Für die variable schwere Kette diente die humane Keimbahnsequenz VH1-46 als Vorlage, für die variable leichte Kette die Sequenz A18.

10

Die humanisierten V_H bzw. V_L Sequenzen SEQ ID NO. 56 bis 79 bzw. 85 bis 94 wurden mit Hilfe der gene assembly PCR (single-overlap extension PCR) hergestellt. Die PCR Reaktion erfolgte nach folgendem Schema: erste Denaturierung 94°C für 2min, dann 30 Zyklen Denaturierung bei 94°C für 45 sec, Annealing bei 55°C für 45 sec und Elongation bei 73°C für 1,5 min und am Ende einen Elongationsschritt bei 73°C für 7 min.

Die so hergestellten V_H und V_L Ketten wurden mit den Enzymen NcoI und XhoI bzw. NotI und XhoI geschnitten und zur Sequenzierung in einen Klonierungsvektor (pLitmus 28 bzw. pBluescript KS) kloniert. Die richtigen V_H und V_L Ketten wurden anschließend erneut amplifiziert, um am 3'-Ende der V_H und am 5'-Ende der V_L eine BbsI Schnittstelle einzufügen, um darüber die V_H und die V_L mit nur einem Alanin als Linker zu verknüpfen. Nach der Ligation wurden die kompletten scFv (die Ligationsprodukte) unter Verwendung der flankierenden Primer amplifiziert und in einen bakteriellen Expressionsvektor kloniert.

30

7. Spezifitätsanalyse der Core-1 spezifischen Erkennungsmoleküle im ELISA

Als Antigene wurden verschiedene Kohlenhydrat-PAA-Konjugate (Synthesome) und Glykoproteine verwendet: Asialoglykophorin

35

(AGP), Glykophorin (GP) und Asialofetuin (Sigma); die PAA (Poly[N-(2-hydroxyethyl) Acrylamid]-Konjugate: Gal β 1-3GalNAc α 1-OC₃H₆NH-PAA und Gal β 1-3GalNAc α 1-p-OC₆H₄NH-PAA als Core-1 (alpha-Anomer) Konjugate mit unterschiedlichen Linkerlängen, Gal β 1-3GalNAc β 1-OC₃H₆NH-PAA als beta-Anomer des Core-1, Gal α 1-3GalNAc α 1-OC₃H₆NH-PAA und Gal α 1-3GalNAc β 1-OC₃H₆NH-PAA als weitere Stereoanomere des Core-1, die Core-2 Struktur Gal β 1-3 (GlcNAc β 1-6) GalNAc α 1-OC₃H₆NH-PAA und die Derivate GalNAc α 1-OC₃H₆NH-PAA, Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc α 1-OC₃H₆NH-PAA, Gal β 1-3 (Neu5Ac α 2-6) GalNAc α 1-OC₃H₆NH-PAA, GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc α 1-OC₃H₆NH-PAA, GlcNAc α 1-3Gal β 1-3GalNAc α 1-OC₃H₆NH-PAA, GalNAc α 1-3Gal β 1-OC₃H₆NH-PAA und 3'-O-Su-Gal β 1-3GalNAc α 1-OC₃H₆NH-PAA.

- 15 Aus den jeweiligen Stammlösungen (1mg in 1ml Bi-dest.H₂O), die portioniert bei -20°C aufbewahrt werden, wurde eine Verdünnung von 5 µg/ml in PBS hergestellt. Davon wurden 50µl/well in eine Mikrotiterplatte (NUNC-ON-TC Microwell 96 F) pipettiert und die Testplatte 1 h bei 37°C und über Nacht bei 4°C inkubiert.
- 20 Am nächsten Tag wurde die Testplatte mit PBS/0,2% Tween 3x gewaschen. Anschließend wurden mit 2% BSA in PBS unspezifische Bindungsstellen blockiert und 50 µl des ersten Antikörpers aufgetragen (chimärer IgG bzw. IgM: gereinigt 0,1 µg/ml in PBS/0,1% BSA oder unverdünnter Kulturüberstand produzierender
- 25 CHOdhr- Zellen; Multibodies: 10 µg/ml in PBS/0,1% BSA). Nach drei Waschschritten mit PBS/0,2% Tween wurden zum Nachweis der spezifisch gebundenen Antikörperkonstrukte die entsprechenden Zweit-Antikörper, Peroxidase-gekoppelt, eingesetzt (ein anti-Maus bzw. anti-human Fc γ 1 bzw. μ -Antikörper für die ganzen
- 30 Antikörper, ein anti-His Tag-Antikörper für Multibodies). Zum Nachweis des gebundenen sekundären Antikörpers erfolgte eine Farbreaktion mit TMB (3,3',5,5'- Tetramethylbenzidine). Nach 15 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 2,5N H₂SO₄ abgestoppt. Die Messung erfolgte mit einem

Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450nm im Dual-mode gegen einen Referenzfilter 630nm.

Repräsentative Ergebnisse sind in den Abbildungen 5 und 6 dargestellt. In Abbildung 5 sind zwei Erkennungsmoleküle mit variierenden Loop-Sequenzen im IgM-Format verglichen. Die Antikörperkonstrukte mIgM-Karo2 (SEQ ID NO. 107 und SEQ ID NO. 109) und mIgM-Karo4 (SEQ ID NO. 108 und SEQ ID NO. 110) binden hochspezifisch an das Antigen Core-1, bevorzugt an das alpha-Anomer Gal β 1-3GalNAc α und schwächer an das beta-Anomer Gal β 1-3GalNAc β . Die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle können auch nur das alpha-Anomer Gal β 1-3GalNAc α oder beide Anomere Gal β 1-3GalNAc α und Gal β 1-3GalNAc β in gleicher Weise binden. Zusätzlich bindet mIgM-Karo4 die Core-2 Struktur Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α . Alle anderen getesteten Kohlenhydratstrukturen, auch strukturell stark verwandte Strukturen werden durch die hier beanspruchten Bindungsproteine nicht erkannt. Als Core-1 tragendes Glykoprotein zeigt AGP ein starkes Signal mit beiden Varianten, wobei das ebenfalls Core-1 tragende Glykoprotein Asialofetuin deutlich stärker mit der Karo2-Variante reagiert, was sehr wahrscheinlich mit der unterschiedlichen Core-1 Dichte in beiden Proteinen zusammenhängt. Abbildung 6 zeigt das Spezifitätsmuster der beispielhaft ausgewählten humanisierten Erkennungsmoleküle Karo11 (SEQ ID NO. 56 und SEQ ID NO. 90), Karo21 (SEQ ID NO. 59 und SEQ ID NO. 90) und Karo38 (SEQ ID NO. 69 und SEQ ID NO. 90) mit variierenden Gerüstsequenzen im scFv-Format mit einer Aminosäure als Linker. Auch hier zeigt sich das gleiche Spezifitätsmuster, wie in der Definition der Core-1 spezifischen Bindung im Sinne der Erfindung beschrieben (siehe oben).

Die spezifische Bindung der verschiedenen bevorzugten Formate und Kombinationen im ELISA, beispielhaft an AGP, GP und/oder

Gal β 1-3GalNAc α 1-OC₃H₆NH-PAA, ist in den Abbildungen 7 a bis e dargestellt.

8. Immunhistologische und immunzytologische Färbungen

Für die immunhistologischen Färbungen wurden Gefrierschnitte entsprechender Gewebeproben luftgetrocknet und mit 10% Formaldehyd in PBS 15 min fixiert. Zur Reduktion der endogenen Peroxidase-Aktivität wurden die Schnitte mit 3% Wasserstoffperoxid in PBS behandelt und nach Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit präabsorbiertem Kaninchenserum an Neuraminidase-behandelten Erythrozyten mit einem Core-1 spezifischen Primärantikörper inkubiert. Anschließend wurden die Präparate mit einem entsprechenden Sekundärantikörper (anti-Maus bzw. anti-human IgG oder IgM, POD gekoppelt) inkubiert. Die Farbreaktion erfolgte unter Verwendung des Peroxidase-Substrats Diaminobenzidin und die Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

Das beispielhafte erfindungsgemäße Erkennungsmolekül mIgM-Karo4 reagiert nur mit sehr wenigen Strukturen im Normalgewebe. Diese befinden sich aber in für einen Antikörper nicht zugänglichen Bereichen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Reaktion von humanem Normalgewebe mit dem Core-1 spezifischen Antikörper mIgM-Karo4

Gewebetyp	Reaktivität
Epidermis - Basalmembran	negativ
Magen	
Foveola Epithelium	negativ
Fundusdrüsen	negativ
Korpusdrüsen	negativ
Colon Mucosa	negativ
Milz	

	Trabeculae lienis	negativ
	Retikularzellen	negativ
	Lymphozyten	negativ
	Endothelium	negativ
5	Prostata	negativ
	Leber	negativ
	Hepatozyten	negativ
	Kupffer-Zellen	negativ
	Gallenwege	negativ
10	Lymphknoten	negativ
	Lymphozyten	negativ
	Retikularzellen	negativ
	Gallenblase	negativ
	Nebenniere	negativ
15	Nebennierenrinde	negativ
	Nebennierenmark	negativ
	Blase	negativ
	Herz	negativ
	Bauchspeicheldrüse	negativ
20	Drüsengänge	positiv
	Azini	negativ
	Langerhans'sche Inseln	negativ

Die beanspruchten Erkennungsmoleküle reagieren positiv mit einer Vielzahl von Karzinomen. Die Daten in Tabelle 4 zeigen, dass die Core-1 spezifischen Erkennungsmoleküle einen großen Prozentsatz an Tumorpatienten einer Indikation erkennen, der von Indikation zu Indikation unterschiedlich ist.

Tabelle 4: Reaktion von humanem Tumorgewebe mit dem Core-1 spezifischen Antikörper mIgM-Karo4

Gewebetyp	Reaktivität
Colonkarzinom	
primäres Karzinom	

	Lebermetastasen	20/22
	Lungenkarzinom	
	Großzelliges	3/8
	Bronchoalveolar	1/1
5	Adenokarzinom	6/6
	Blasenkarzinom	5/9
	Magenkarzinom	
	Intestinaler Typ	8/8
	Diffuseer Typ	3/3
10	Prostatakarzinom	9/9
	Mammakarzinom	
	Intraductal/ductal	8/10
	Schwach differenziert	2/5
	Muzinöses	1/1
15	Schilddrüsenkarzinom	0/10
	Nierenkarzinom	
	Klarzelliges	4/9
	Transitionalzelliges	2/5
	Zervikalkarzinom	1/2
20	Ovarialkarzinom	
	Adenokarzinom	2/2
	Endometrioid	2/2
	Teratom	2/2
	Glioblastom	0/3

25

Für die Entwicklung eines Maus-Tumormodells wurden verschiedene Xenotransplantate untersucht. Bei den Xenotransplantaten handelt es sich um humanes Kolonkarzinomgewebe, das auf Nacktmäusen mehrfach passagiert wurde. Abbildung 8 zeigt beispielhaft eine immunhistochemische Färbung eines Xenotransplantat-Präparats mit dem Core-1 spezifischen Antikörper cIgG-Karo4.

Für die immunzytologischen Färbungen wurde die Immunfluoreszenz eingesetzt. Dafür wurden die entsprechenden

Zellen auf Objektträger angetrocknet und mit 5% Formaldehyd 10 min fixiert. Nach Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit BSA (1% in PBS) wurden die Zellen mit dem Primärantikörper inkubiert. Anschließend wurde 3 mal mit PBS gewaschen und mit dem entsprechenden fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper (anti-Maus oder anti-human IgG bzw. IgM für ganze Antikörper; anti-Myc-Tag oder anti-His-Tag Antikörper für die single chain Antikörperfragmente) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in Mowiol eingebettet.

Es wurden verschiedene Zelllinien mit Core-1 spezifischen Erkennungsmolekülen in der Immunfluoreszenz getestet. Eine Reihe von Tumorzelllinien und auch einigen Leukämie-Zelllinien reagieren positiv (Tab. 5 und Abb. 9).

Tabelle 5: Reaktivität verschiedener Zelllinien mit den Core-1 spezifischen Antikörpern mIgM-Karo1 bzw. mIgM-Karo4

Zelllinien	Reaktivität
KG-1	positiv
ZR-75-1	positiv
T47D	(positiv) wenige Zellen
U266	negativ
LN78	positiv
HT29	positiv
HCT116	negativ
HepG2	negativ
K562	negativ

Abbildung 9 zeigt beispielhaft eine Fluoreszenzmarkierung von KG-1 Zellen, einer akuten myeloischen Leukämie-Zelllinie, mit verschiedenen Antikörperkonstrukten, einem murinen IgM und

zwei scFv-Antikörpern mit unterschiedlicher Linkerlänge (SEQ ID NO. 95 mit 18 Aminosäuren und SEQ ID NO. 104 mit einer Aminosäure als Linker). Alle drei Konstrukte zeigen eine spezifische Färbung der Tumorzelllinie, wobei das monovalente Antikörperfragment SEQ ID NO. 95 das schwächste Signal zeigt.

9. Chelatisierung und radioaktive Markierung von Antikörpern und Antikörperfragmenten

Durch Konjugation wurde an den Antikörper cIgG-Karo4 bzw. den Multibody mit der Sequenz SEQ ID NO. 104 ein Chelator kovalent gebunden, der die Bindung eines Radiometalls ermöglicht. Als Chelatoren kamen die kommerziellen Produkte der Firma Macrocylics (Dallas, USA), p-isothiocyanatobenzyl-diethylenetriaminepentaacetic acid (p-SCN-Bz-DTPA) und p-isothiocyanatobenzyl -1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (p-SCN-Bz-DOTA) zum Einsatz. Beide Chelatoren eignen sich zur Kopplung an Antikörper zu deren Radioaktivmarkierung [Brecht et al., 1986; Kozak et al., 1989; Stimmel et al., 1995].

Die Konjugation erfolgte durch Reaktion der Isothiocyanatgruppe des Chelators mit einer freien ε-Aminogruppe der Aminosäure Lysin am Antikörper. Es entsteht eine kovalente N-C-Bindung zwischen Chelator und Antikörper.

Der gereinigte Antikörper bzw. das gereinigte Antikörperfragment muß zunächst in Kopplungspuffer pH 8,7 umgepuffert werden. Hierzu wurde eine Ultrafiltration in einer Filtrationshülse (Centriprep YM50 (Amicon)) durchgeführt. Dies erfolgte durch mehrmalige Verdünnung mit 10-fachem Volumen und Filtration durch eine Membran mit definierter Porengröße durch Zentrifugation. Dadurch wurde PBS durch den alkalischen Kopplungspuffer (0,05 M Natrium-Carbonat, 0,15 M Natriumchlorid, pH 8,7) ersetzt.

Die Chelatisierung wurde mit den bifunktionellen Chelatoren p-SCN-Bz-DTPA- bzw. p-SCN-Bz-DOTA durchgeführt. Zur Chelatisierungsreaktion wurden Protein (1-10 mg/ml) in Kopplungspuffer und eine Lösung des Chelators von 1 mg/ml in 2% DMSO/Wasser so gemischt, dass ein molarer Überschuß des Chelators gewährleistet war. Es folgte eine Inkubation der Mischung von 1h bei 37°C. Anschließend wurde nicht gebundener Chelator durch Ultrafiltration im gleichen Gefäß (Centriprep YM50 (Amicon)) abgetrennt und wie oben beschrieben in den zur Radioaktivmarkierung notwendigen Beladungspuffer auf pH 4,2 umgepuffert (0,15 M Natriumacetat, 0,15 M Natriumchlorid, pH 4,2). Die Proteinkonzentration während und nach diesem Schritt wurde wieder auf 1-10mg/ml mit Hilfe einer UV-Messung bei 280nm eingestellt.

Es waren Bedingungen für die Chelatisierungsreaktion zu finden, die eine Radiomarkierung des Antikörpers erlauben, ohne dessen Bioaktivität wesentlich zu mindern.

Der chelatisierte Antikörper wurde mit einem Radiometall beladen, wodurch der Radio-Antikörper erzeugt wurde. Zur Beladung wurden die Isotope $^{111}\text{Indium}$ und $^{90}\text{Yttrium}$ verwendet. Beide haben chemisch und physikochemisch vergleichbare Eigenschaften und werden durch den Chelator als dreiwertige Ionen gebunden ($^{111}\text{In}^{3+}$, $^{90}\text{Y}^{3+}$). Der mit $^{111}\text{Indium}$ markierte Antikörper ist ein γ -Strahler und wird in der Klinik zur individuellen Dosisfindung für den Patienten verwendet, während $^{90}\text{Yttrium}$ ein β -Strahler ist, der therapeutisch zum Einsatz kommt. Die Halbwertszeiten betragen für ^{111}In 67 Stunden und für ^{90}Y 64 Stunden.

Zur Beladung wurde $^{111}\text{Indiumchlorid}$ der Firma NEN (Perkin Elmer, Belgien) verwendet. Die Lieferung des Radiometalls erfolgt in salzsaurer Lösung. Diese $^{111}\text{InCl}_3$ Lösung wurde

zunächst kurzzeitig auf eine HCl-Konzentration von 1M gebracht. Anschließend wurde mit 0,05M HCl auf eine spezifische Aktivität von 80-320mCi/ml verdünnt und davon ein Aliquot zum Einbau in den chelatisierten Antikörper verwendet, wobei das zugegebene Volumen HCl-saurer $^{111}\text{InCl}_3$ -Lösung gleich dem Volumen der vorgelegten Antikörperlösung im Kopplungspuffer pH 4,2 sein sollte, um die pH-Stabilität zu gewährleisten. Inkubationsdauer war 1h bei 37°C mit gelegentlichem vorsichtigem Mischen.

10

Im Anschluß daran wurde der Filtereinsatz wieder in die Filtrationshülse eingesetzt und wie oben beschrieben in Phosphatpuffer pH 7,2 mit physiologischem Gehalt an Kochsalz umgepuffert. Dabei erfolgte eine Trennung von hochmolekularem radioaktiv markiertem Antikörper und ungebundenem $^{111}\text{InCl}_3$. Die Quantifizierung des Einbaus von ^{111}In in den chelatisierten Antikörper erfolgte dünnschichtchromatographisch. Die Einbaurate des Radiometalls lag bei 70-99% der eingesetzten Radioaktivität.

20

10. Nachweis des Core-1 positiven, sekretorischen MUC1 im Sandwich-ELISA

Core-1 positives, sekretorisches MUC1 kann im Sandwich-ELISA nachgewiesen werden. Dabei dient ein MUC1 spezifischer Antikörper als Fänger-Antikörper von MUC1 und ein Core-1 spezifischer Antikörper zum Nachweis des Core-1 Antigens. Ein dritter Enzym- oder Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper muss zur Detektion des Zweitantikörpers eingesetzt werden.

30

Als Beispiel wurden die Überstände zweier Tumorzelllinien analysiert (K562 und T47D). Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt. 10^5 Zellen pro ml Zellkulturmedium wurden ausgesät, 4 Tage ohne Mediumwechsel kultiviert, anschließend ein Aliquot abgenommen und der Zellkulturüberstand durch

35

Zentrifugation vom Zellpellet getrennt. 50 μ l dieser Überstände wurden unverdünnt im ELISA eingesetzt. Der anti-MUC1-anti-Core-1-Sandwich-ELISA wurde durchgeführt, indem die Mikrotiterplatte mit dem Fänger-Antikörper (1 μ g/ml) in PBS über Nacht bei 4 °C beschichtet wurde. - Es wurden drei verschiedenen Konzentrationen des Antikörpers für die Beschichtung getestet (1 μ g/ml, 2 μ g/ml und 4 μ g/ml). Die Beschichtung mit 1 μ g/ml erwies sich im Sandwich ELISA als am empfindlichsten. - Anschließend wurden die beschichteten Platten zweimal mit PBS gewaschen und 1,5 h in 5% BSA, 0,05% Tween 20 in PBS bei Raumtemperatur blockiert. Der Blockierungspuffer wurde entfernt, die Platten erneut einmal mit 0,1% Tween 20 in PBS (Waschpuffer) gewaschen, die Proben dazugegeben und 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Als Negativkontrollen wurden das Zellkulturmedium oder 2% BSA in Waschpuffer (Verdünnungspuffer für Zweitantikörper) verwendet. Eine Positivkontrolle stand nicht zur Verfügung. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Neuraminidase Behandlung in den dafür vorgesehenen Wells. Zu diesem Zweck wurde die Neuraminidase-Lösung (DADE Behring, Deutschland) in Imidazolpuffer (0,68 g Imidazol, 0,19 g CaCl_2 und 0,4 g NaCl in 100 ml H_2O , pH 6,8) 1:5 verdünnt und 50 μ l/well 30 min bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde der Imidazolpuffer ohne Neuraminidase-Lösung in einem entsprechenden Well inkubiert. Anschließend wurden die Wells dreimal gewaschen und der mIgM-Karo4 Antikörper zum Nachweis des Core-1 Antigens in einer 1:500 Verdünnung in 2% BSA in Waschpuffer dazugegeben und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen folgte die Zugabe eines Peroxidase-gekoppelten anti Maus IgM(μ) Antikörpers (Dianova) 1:5000 verdünnt in 2% BSA in Waschpuffer und eine Inkubation von 1 h bei Raumtemperatur. Abschließend wurden die Platten zweimal in Waschpuffer und einmal in PBS gewaschen. Die Färbereaktion erfolgte in 25 mM Zitronensäure, Phosphatpuffer pH 5,0 mit 0,04% H_2O_2 und 0,4 mg/ml o-Phenylendiamin (Sigma) im Dunkeln

bei Raumtemperatur. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 2,5 N Schwefelsäure (Endkonzentration 0,07 N) gestoppt und im ELISA-Reader bei 492 nm mit einem Referenzfilter von 620 nm vermessen.

Tabelle 6: Analyse von Core-1 positivem MUC1 in Kulturüberständen zweier Zelllinien mit und ohne Neuraminidase Behandlung im Sandwich ELISA

Zelllinie	Signal	
	- NeuAcdase	+NeuAcdase
K562	-	+
T47D	+	+++

Legende zu den Abbildungen

Abb. 1a: Sequenzen der Linker in den verschiedenen Multibody single chain Antikörperfragmenten.

Abb. 1b: Klonierungsschema zur Herstellung von single chain Antikörperfragmenten mit unterschiedlicher Linkerlänge.

Abb. 2: Vektor zur Klonierung und bakteriellen Expression von single chain Antikörperfragmenten.

Abb. 3: Analyse von Multibodies im scFv Format mit unterschiedlicher Linkerlänge im ELISA.

Multibodies mit den Aminosäuresequenzen SEQ ID NO. 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 103, 104 und 105 wurden wie oben beschrieben in E.coli exprimiert und die Periplasmafraktionen gewonnen. Als Antigen für den ELISA Test wurde Asialoglykophorin, ein

Core-1 tragendes Glykoprotein, eingesetzt. Eine schrittweise Linkerverkürzung führt zu einer Erhöhung der Bindung an Asialoglykophorin. Die besten Bindungseigenschaften zeigen die Varianten mit der SEQ ID NO. 104 und 105. Diese multivalenten Konstrukte im Dia/Triabody Format sind bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung.

Abb. 4: Vektorsystem zur Klonierung und eukaryontischen Expression von chimären Antikörpern im IgG1 oder IgM-Format.

Abb. 5 und 6: Spezifitätsanalyse im ELISA.

Als Antigene wurden verschiedene Glykoproteine und Kohlenhydrat-PAA-Konjugate verwendet. Asialoglykophorin [1]; Glykophorin [2]; Asialofetuin [3]; Gal β 1-3GalNAc α 1-OC₃H₆NH-PAA [4]; Gal β 1-3GalNAc α 1-p-OC₆H₄NH-PAA [5]; Gal α 1-3GalNAc α 1-OC₃H₆NH-PAA [6]; Gal β 1-3GalNAc β 1-OC₃H₆NH-PAA [7]; Gal α 1-3GalNAc β 1-OC₃H₆NH-PAA [8]; Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α 1-OC₃H₆NH-PAA [9]; GalNAc α 1-OC₃H₆NH-PAA [10]; Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc α 1-OC₃H₆NH-PAA [11]; Gal β 1-3(Neu5Ac α 2-6)GalNAc α 1-OC₃H₆NH-PAA [12]; GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc α 1-OC₃H₆NH-PAA [13]; GlcNAc α 1-3Gal β 1-3GalNAc α 1-OC₃H₆NH-PAA [14]; GalNAc α 1-3Gal β 1-OC₃H₆NH-PAA [15]; und 3'-O-Su-Gal β 1-3GalNAc α 1-OC₃H₆NH-PAA [16]. Als Kontrolle wurde BSA [17] verwendet. In Abbildung 5 wurden zwei Antikörper im IgM-Format mit unterschiedlicher CDR-Sequenz-Zusammensetzung eingesetzt. Abbildung 6 zeigt das Spezifitätsmuster von drei humanisierten Erkennungsmolekülen im scFv-Format mit variierenden Gerüstsequenzen.

Abb. 7: Spezifische Bindung verschiedener bevorzugter Formate und Kombinationen erfindungsgemäßer Erkennungsmoleküle im ELISA, beispielhaft an den Antigenen AGP, GP und/oder Core-1-PAA (Gal β 1-3GalNAc α 1-OC₃H₆NH-PAA).

Abb. 8: Immunhistochemische Färbung von Xenotransplantat-Präparaten.

5. Humanes Colonkarzinomgewebe wurde auf Nacktmäuse transplantiert und nach Erreichen einer bestimmten Größe passagiert. Das Tumorgewebe wurde eingebettet und geschnitten und für immunhistochemische Färbungen eingesetzt. In a) wurde das Gewebe mit cIgG-Karo4 als Primärantikörper und einem
10 anti-human Fcy Antikörper - POD gekoppelt als Sekundärantikörper markiert. Die braune Färbung kennzeichnet die Core-1-positiven Strukturen.

15 Abb. 9: Fluoreszenzmarkierung von Zellen der Tumorzelllinie KG-1 mit verschiedenen Core-1 spezifischen Erkennungsmolekülen.

Sequenzen

20

CDR Sequenzen

SEQ ID NO. 1	NYWLG
SEQ ID NO. 2	DIYPGGGYTNYNEKFKG
SEQ ID NO. 3	DIYPGGSYTNYNEKFKG
SEQ ID NO. 4	YDAAGPWFAY
SEQ ID NO. 5	YDAAGPGFAY
30 SEQ ID NO. 6	YDNHYFDY
SEQ ID NO. 7	RSSQSIVHSNGNTYLE
SEQ ID NO. 8	RSSQSLLHSNGNTYLH
SEQ ID NO. 9	KSSQSLLHSDGKTYLY
35 SEQ ID NO. 10	KVSNRFS

SEQ ID NO. 11 EVSSRFS

SEQ ID NO. 12 FQGSHPVYT

SEQ ID NO. 13 SQSTHVPYT

5

CDR Sequenzen (canonical structure variants)

SEQ ID NO. 14 NYWIG

SEQ ID NO. 15 NYWMG

10 SEQ ID NO. 16 NYWWG

SEQ ID NO. 17 NYWVG

SEQ ID NO. 18 DIYPGGDYTNYNEKFKG

SEQ ID NO. 19 DIYPGGNYTNYNEKFKG

15 SEQ ID NO. 20 DIYTGGGYTNYNEKFKG

SEQ ID NO. 21 DIYTGGDYTNYNEKFKG

SEQ ID NO. 22 DIYTGGNYTNYNEKFKG

SEQ ID NO. 23 DIYTGGSYTNYNEKFKG

SEQ ID NO. 24 DIYAGGGYTNYNEKFKG

20 SEQ ID NO. 25 DIYAGGDYTNYNEKFKG

SEQ ID NO. 26 DIYAGGNYTNYNEKFKG

SEQ ID NO. 27 DIYAGGSYTNYNEKFKG

SEQ ID NO. 28 RPSQSIVHSNGNTYLE

25 SEQ ID NO. 29 RSSQSLVHSNGNTYLE

SEQ ID NO. 30 RSSQSIVHSNGNTYFE

SEQ ID NO. 31 RPSQSLVHSNGNTYLE

SEQ ID NO. 32 RPSQSIVHSNGNTYFE

SEQ ID NO. 33 RSSQSLVHSNGNTYFE

30 SEQ ID NO. 34 RPSQSLLHSNGNTYLH

SEQ ID NO. 35 RSSQSILHSNGNTYLH

SEQ ID NO. 36 RSSQSLLHSNGNTYFH

SEQ ID NO. 37 RPSQSILHSNGNTYLH

SEQ ID NO. 38 RPSQSLLHSNGNTYFH

35 SEQ ID NO. 39 RSSQSILHSNGNTYFH

SEQ ID NO. 40 KPSQSLHSDGKTYLY
SEQ ID NO. 41 KSSQSILHSDGKTYLY
SEQ ID NO. 42 KSSQSLHSDGKTYFY
SEQ ID NO. 43 KPSQSILHSDGKTYLY
5 SEQ ID NO. 44 KPSQSLHSDGKTYFY
SEQ ID NO. 45 KSSQSILHSDGKTYFY

variable schwere Ketten VH

10 SEQ ID NO. 46
QVQLKESGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPBGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAYYDAAGPGFAYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO. 47

15 QVQLKQSGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPBGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARYDNHYFDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO. 48

20 QVQLKQSGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPBGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAYYDAAGPWFAYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO. 49

25 EVKLVESGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPBGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAYYDAAGPWFAYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO. 50

QVQLKESGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPBGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAYYDAAGPWFAYWGQGTTVTVSS

30 SEQ ID NO. 51

EVKLVESGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPBGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAYYDAAGPWFAYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO. 52

QVQLKQSGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPBGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAYYDAAGPWFAYWGQGTTLVTVSA

5 SEQ ID NO. 53

QVQLKQSGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPBGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAYYDAAGPWFAYWGQGTTLVTVSS

SEQ ID NO. 54

10 QVTLKESGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPBGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAYYDAAGPWFAYWGQGTSTVTVSS

SEQ ID NO. 55

15 QVQLKQSGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPBGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAYYDAAGPWFAYWGQGTSTVTVSS

SEQ ID NO. 56

20 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWLGWVRQAPGQGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAYYDAAGPWFAYWGQGTTLVTVSS

SEQ ID NO. 57

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWLGWVRQAPGQGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAYYDAAGPWFAYWGQGTTLVTVSS

25 SEQ ID NO. 58

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWLGWVRQAPGQGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCAYYDAAGPWFAYWGQGTTLVTVSS

SEQ ID NO. 59

30 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWLGWVRQAPGQGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGKATLTADTSSSTAYMELSSLTSEDSAVYFCAYYDAAGPWFAYWGQGTTLVTVSS

SEQ ID NO. 60

35 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWLGWVKQRPQGLERIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAYYDAAGPWFAYWGQGTTLVTVSS

SEQ ID NO. 61

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWLGWVKQRPQGQLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAYYDAAGPWFAYWGQGLTVTVSS

5

SEQ ID NO. 62

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWLGWVRQAPQGQLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGKATLTADTSTSTAYMELSSLTSEDSAVYFCAYYDAAGPWFAYWGQGLTVTVSS

10 SEQ ID NO. 63

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWLGWVRQAPQGQLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGKATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDSAVYFCAYYDAAGPWFAYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO. 64

15 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWLGWVRQAPQGQLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGKATLTADTSTSTAYMELSSLTSEDSAVYYCAYYDAAGPWFAYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO. 65

20 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWLGWVKQRPQGQLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGKATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCAYYDAAGPWFAYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO. 66

25 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWLGWVKQRPQGQLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGKATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAYYDAAGPWFAYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO. 67

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVPCKASGYTFTNYWLGWVKQRPQGQLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGKATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAYYDAAGPWFAYWGQGLTVTVSS

30 SEQ ID NO. 68

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWLGWVKQRPQGQLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGKATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAYYDAAGPWFAYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO. 69

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWLGWVRQAPGQGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGKATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAYYDAAGPWFAYWGQGLTVTVSS

5 SEQ ID NO. 70

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWLGWVRQAPGQGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGKATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAYYDAAGPWFAYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO. 71

10 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWLGWVKQRPQGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGKATLTADTSTSTAYMELSSLTSEDSAVYYCAYYDAAGPWFAYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO. 72

15 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWLGWVKQRPQGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGKATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCAYYDAAGPWFAYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO. 73

20 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWLGWVRQAPGQGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAYYDAAGPWFAYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO. 74

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWLGWVRQAPGQGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGKATLTADTSTSTAYMELSSLTSEDSAVYFCAYYDAAGPWFAYWGQGLTVTVSS

25 SEQ ID NO. 75

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWLGWVKQRPQGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCAYYDAAGPWFAYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO. 76

30 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWLGWVRQAPGQGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAYYDAAGPWFAYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO. 77

35 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWLGWVKQRPQGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAYYDAAGPWFAYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO. 78

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWLGWVRQAPGQGLEWMGDIYPGGGYTNYNE
KFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAYYDAAGPWFAYWGQGTLLVTVSS

5

SEQ ID NO. 79

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWLGWVRQAPGQGLEWMGDIYPGGGYTNYNE
KFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAYYDAAGPWFAYWGQGTLLVTVSS

10 variable leichte Ketten

SEQ ID NO. 80

DIQMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPYTFGGGTKLEIKRA

15

SEQ ID NO. 81

DIVITQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLLHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPYTFGGGTKLEIKRA

20 SEQ ID NO. 82

DIQMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPYTFGGGTKLEIKRA

SEQ ID NO. 83

25 DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPYTFGGGTKLEIKRA

SEQ ID NO. 84

30 DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPYTFGGGTKLEIKRA

SEQ ID NO. 85

DIQMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGGGTKVEIKRA

35

SEQ ID NO. 86

DIQMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPTFGQGTKVEIKRA

5 SEQ ID NO. 87

DIQMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPTFGGGTKVEIKRA

SEQ ID NO. 88

10 DIQMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPTFGQGTKVEIKRA

SEQ ID NO. 89

DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFG
15 VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPTFGGGTKVEIKRA

SEQ ID NO. 90

DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFG
20 VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPTFGQGTKVEIKRA

SEQ ID NO. 91

DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPTFGGGTKVEIKRA

25 SEQ ID NO. 92

DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPTFGQGTKVEIKRA

SEQ ID NO. 93

30 DIVMTQTPLSLPVTTPGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPTFGQGTKVEIKRA

SEQ ID NO. 94

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFG
35 VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPTFGQGTKVEIKRA

VH/VL Paarungen

Mausantikörper

5

Karo1 SEQ ID NO. 46
 SEQ ID NO. 80

10

Karo2 SEQ ID NO. 47
 SEQ ID NO. 81

Karo3 SEQ ID NO. 48
 SEQ ID NO. 80

15 Karo4 SEQ ID NO. 50
 SEQ ID NO. 80

20

Karo5 SEQ ID NO. 53
 SEQ ID NO. 82

Karo6 SEQ ID NO. 52
 SEQ ID NO. 83

25

Karo7 SEQ ID NO. 55
 SEQ ID NO. 83

Karo8 SEQ ID NO. 54
 SEQ ID NO. 80

30 Karo9 SEQ ID NO. 51
 SEQ ID NO. 83

Karo10 SEQ ID NO. 49
 SEQ ID NO. 80

35

humanisierte Sequenzen

	Karo11	SEQ ID NO. 56
		SEQ ID NO. 90
5		
	Karo12	SEQ ID NO. 57
		SEQ ID NO. 90
	Karo13	SEQ ID NO. 57
10		SEQ ID NO. 86
	Karo14	SEQ ID NO. 58
		SEQ ID NO. 87
15	Karo15	SEQ ID NO. 56
		SEQ ID NO. 91
	Karo16	SEQ ID NO. 59
		SEQ ID NO. 91
20		
	Karo17	SEQ ID NO. 60
		SEQ ID NO. 87
	Karo18	SEQ ID NO. 61
25		SEQ ID NO. 90
	Karo19	SEQ ID NO. 56
		SEQ ID NO. 88
30	Karo20	SEQ ID NO. 56
		SEQ ID NO. 85
	Karo21	SEQ ID NO. 59
		SEQ ID NO. 90

Karo22

SEQ ID NO. 62

SEQ ID NO. 90

Karo23

SEQ ID NO. 59

SEQ ID NO. 86

Karo24

SEQ ID NO. 74

SEQ ID NO. 92

10 Karo25

SEQ ID NO. 63

SEQ ID NO. 87

Karo26

SEQ ID NO. 74

SEQ ID NO. 87

15

Karo27

SEQ ID NO. 74

SEQ ID NO. 89

Karo28

SEQ ID NO. 74

SEQ ID NO. 85

20

Karo29

SEQ ID NO. 64

SEQ ID NO. 86

25 Karo30

SEQ ID NO. 74

SEQ ID NO. 86

Karo31

SEQ ID NO. 63

SEQ ID NO. 86

30

Karo32

SEQ ID NO. 65

SEQ ID NO. 85

Karo33

SEQ ID NO. 65

SEQ ID NO. 86

35

Karo34

SEQ ID NO. 66

SEQ ID NO. 85

5 Karo35

SEQ ID NO. 67

SEQ ID NO. 87

Karo36

SEQ ID NO. 68

SEQ ID NO. 86

10

Karo37

SEQ ID NO. 72

SEQ ID NO. 88

Karo38

SEQ ID NO. 69

SEQ ID NO. 90

15

Karo39

SEQ ID NO. 70

SEQ ID NO. 90

20 Karo40

SEQ ID NO. 69

SEQ ID NO. 92

Karo41

SEQ ID NO. 73

SEQ ID NO. 86

25

Karo42

SEQ ID NO. 69

SEQ ID NO. 89

Karo43

SEQ ID NO. 71

SEQ ID NO. 92

30

Karo44

SEQ ID NO. 56

SEQ ID NO. 86

35 Karo45

SEQ ID NO. 65

SEQ ID NO. 92

verschiedene single chain Fv Formate

5 SEQ ID NO. 95

QVQLKESGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPBGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAYYDAAGPGFAYWGQGTTVTVSSASSGG
GGSGGGSGGSARDIQMTQTPLSLPVSLGDAQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSP
KLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPTFGGGGTKLEI
10 KRAAAHHHHHHGAAEQKLISEEDLNGAA

9 SEQ ID NO. 96

QVQLKESGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPBGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAYYDAAGPGFAYWGQGTTVTVSSASSGS
15 GSSADIQMTQTPLSLPVSLGDAQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPTFGGGGTKLEIKRAAAHHHHH
HHGAAEQKLISEEDLNGAA

SEQ ID NO. 97

20 QVQLKESGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPBGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAYYDAAGPGFAYWGQGTTVTVSSASSGG
SSADIQMTQTPLSLPVSLGDAQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPTFGGGGTKLEIKRAAAHHHHH
HGAAEQKLISEEDLNGAA

25

SEQ ID NO. 98

QVQLKESGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPBGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAYYDAAGPGFAYWGQGTTVTVSSASSGS
SADIQMTQTPLSLPVSLGDAQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPTFGGGGTKLEIKRAAAHHHHH
30 GAEEQKLISEEDLNGAA

SEQ ID NO. 99

QVQLKESGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPBGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
35 KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAYYDAAGPGFAYWGQGTTVTVSSASSSS

ADIQMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS
 GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPTFGGGTKLEIKRAAAHHHHHHG
 AAQKLISEEDLNGAA

5 SEQ ID NO. 100

QVQLKESGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPBGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
 KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAYYDAAGPGFAYWGQGTITVTVSSASSA
 DIQMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSG
 VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPTFGGGTKLEIKRAAAHHHHHHGA
 10 AQKLISEEDLNGAA

SEQ ID NO. 101

QVQLKESGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPBGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
 KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAYYDAAGPGFAYWGQGTITVTVSSASSA
 15 IQMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGV
 PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPTFGGGTKLEIKRAAAHHHHHHGAA
 EQKLISEEDLNGAA

SEQ ID NO. 102

20 QVQLKESGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPBGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
 KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAYYDAAGPGFAYWGQGTITVTVSSASADI
 QMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVP
 DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPTFGGGTKLEIKRAAAHHHHHHGAEE
 QKLISEEDLNGAA

25

SEQ ID NO. 103

QVQLKESGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPBGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
 KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAYYDAAGPGFAYWGQGTITVTVSSAADIQ
 MTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPD
 30 RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPTFGGGTKLEIKRAAAHHHHHHGAEEQ
 KLISEEDLNGAA

SEQ ID NO. 104

QVQLKESGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPBGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
 35 KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAYYDAAGPGFAYWGQGTITVTVSSADIQM

TQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFS GVPDR
 FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPTFGGGTKLEIKRAAAHHHHHHGAAEQK
 LISEEDLNGAA

5 SEQ ID NO. 105

QVQLKESGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRP GHGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
 KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAYYDAAGPGFAYWGQGT TTVTVSSDIQMT
 QTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFS GVPDRF
 SSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPTFGGGTKLEIKRAAAHHHHHHGAAEQKL
 10 ISEEDLNGAA

SEQ ID NO. 106

QVQLKESGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRP GHGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
 KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAYYDAAGPGFAYWGQGT TTVTVSDIQMTQ
 15 TPLSLPVS LGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFS GVPDRFS
 GSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPTFGGGTKLEIKRAAAHHHHHHGAAEQKLI
 SEEDLNGAA

Murine Antikörper

20

SEQ ID NO. 107

DIVITQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLLHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFS G
 VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPVPTFGGGTKLEIKRADAAPT VSIFF
 PSSEQLTSGGASVVCFLNFPK DINVKKIDG SERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLT L
 25 TKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFN RNEC

SEQ ID NO. 108

DIQMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFS G
 VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPTFGGGTKLEIKRADAAPT VSIFF
 30 PSSEQLTSGGASVVCFLNFPK DINVKKIDG SERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLT L
 TKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFN RNEC

SEQ ID NO. 109

QVQLKQSGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRP GHGLEWIGDIYPGGSYTNYNE
 35 KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARYDNHYFDYWGQGTTLTVSE SQSFPNV

FPLVSCESPLSDKNLVAMGCLARDFLPSTISFTWNYQNNTEVIQGIRTFPTLRTGGKYLATS
 QVLLSPKSILEGSDEYLVCKIHYGGKNRDLHVPIPAVAEMNPNVNVFVPPRDGFSGPAPRKS
 KLICEATNFTPKPITVSWLKDGLVESGFTTDPVTIENKGSTPQTYKVISTLTISEIDWLNL
 NVYTCTVDHRGLTFLKNVSSTCAASPSTDILTFTIPPSFADIFLSKKSANLTCLVSNLATYET
 5 LNISWASQSUGEPLETKIKIMESHPPNGTFSAGVASVCVEDWNNRKEFVCTVTHRDLPSPQKK
 FISKPNEVHKHPPAVYLLPPAREQLNLRESATVTCLVKGFSPADISVQWLQRGQLLPQEKYV
 TSAPMPEPGAPGFYFTHSILTVTEEEWNSGETYTCVVGHEALPHLVTERTVDKSTGKPTLYN
 VSLIMSDTGGTCY

10 SEQ ID NO. 110

QVQLKESGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPBGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
 KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAYYDAAGPWFAYWGQGTTVTVSESQSFP
 NVFPLVSCESPLSDKNLVAMGCLARDFLPSTISFTWNYQNNTEVIQGIRTFPTLRTGGKYLA
 TSQVLLSPKSILEGSDEYLVCKIHYGGKNRDLHVPIPAVAEMNPNVNVFVPPRDGFSGPAPR
 15 KSKLICEATNFTPKPITVSWLKDGLVESGFTTDPVTIENKGSTPQTYKVISTLTISEIDWL
 NLNVYTCTVDHRGLTFLKNVSSTCAASPSTDILTFTIPPSFADIFLSKKSANLTCLVSNLATY
 ETLNISWASQSUGEPLETKIKIMESHPPNGTFSAGVASVCVEDWNNRKEFVCTVTHRDLPSPQ
 KKFISKPNEVHKHPPAVYLLPPAREQLNLRESATVTCLVKGFSPADISVQWLQRGQLLPQEK
 YVTSAPMPEPGAPGFYFTHSILTVTEEEWNSGETYTCVVGHEALPHLVTERTVDKSTGKPTL
 20 YNVSLIMSDTGGTCY

mIgM-Karo2

SEQ ID NO. 109

SEQ ID NO. 107

25 mIgM-Karo4

SEQ ID NO. 110

SEQ ID NO. 108

Chimäre Antikörper (Maus/Mensch)

30 SEQ ID NO. 111

QVQLKESGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPBGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
 KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAYYDAAGPWFAYWGQGTTVTVSGSTKGP
 SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
 VTPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
 35 KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL

HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALH
 NHYTQKSLSLSPGK

5 SEQ ID NO. 112

QVQLKESGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNE
 KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAYYDAAGPWFAYWGQGTTVTVSGSASAP
 TLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITLSWKYKNNSDISSSTRGFPSVLRGGKYAAT
 SQVLLPSKDVMQGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSFVFPVRDGFNPRKS
 10 KLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSQVTTDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLGQ
 SMFTCRVDHRGLTFQONASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTDLTITYDS
 VTISWTRONGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWNNGERFTCTVTHTDLPSPKQ
 TISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADVVFVQWMQRGQPLSPEKYV
 TSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYN
 15 VSLVMSDTAGTCY

SEQ ID NO. 113

DIQMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSG
 VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFP
 20 PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTTL
 SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

chimäre Antikörper

25 cIgG-Karo4 SEQ ID NO. 111
 SEQ ID NO. 113

cIgM-Karo4 SEQ ID NO. 112
 SEQ ID NO. 113

Patentansprüche

1. Erkennungsmolekül, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Aminosäuresequenz umfasst, die

- (i) die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 1 und
 - (ii) die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 2 oder 3 und
 - (iii) die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 4, 5 oder 6
- enthält und

das Antigen Core-1 spezifisch bindet.

2. Erkennungsmolekül nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es weiterhin eine Aminosäuresequenz umfasst, die

- (i) die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 7 oder 8 oder 9 und
 - (ii) die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 10 oder 11 und
 - (iii) die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 12 oder 13 enthält
- und

das Antigen Core-1 spezifisch bindet.

3. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es durch Mutation, Deletion und/oder Insertion in mindestens einer der Sequenzen SEQ ID NO. 1 bis 13 modifiziert ist und das Antigen Core-1 spezifisch bindet.

4. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine Aminosäure mindestens einer Sequenz gemäß SEQ ID NO. 1 bis 13 durch eine Aminosäure mit analogen physikochemischen Eigenschaften ersetzt ist und dass das Erkennungsmolekül das Antigen Core-1 spezifisch bindet.

5. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Sequenz SEQ ID NO. 1 durch eine äquivalente kanonische Strukturvariante gemäß SEQ ID NO. 14 bis 17 ersetzt ist und/oder mindestens eine Sequenz der

Sequenzen SEQ ID NO. 2 oder 3 durch eine äquivalente kanonische Strukturvariante gemäß SEQ ID NO. 18 bis 27 ersetzt ist und/oder mindestens eine Sequenz gemäß SEQ ID NO. 7 bis 9 durch eine äquivalente kanonische Strukturvariante gemäß SEQ ID NO. 28 bis 45 ersetzt ist und das Erkennungsmolekül das Antigen Core-1 spezifisch bindet.

6. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass es Aminosäuresequenzen umfasst, die mindestens eine Homologie von mindestens 60%, vorzugsweise 70%, bevorzugt 80%, ganz besonders bevorzugt 90%, gegenüber den Sequenzen SEQ ID NO. 1 bis 13 aufweist, wobei das Erkennungsmolekül das Antigen Core-1 spezifisch bindet.

7. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass es weiterhin Gerüstsequenzen umfasst, die die Aminosäuresequenzen voneinander trennen, einschließen und/oder flankieren.

8. Erkennungsmolekül nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Gerüstsequenzen ausgewählt sind aus der Gruppe umfassend die Immunglobulin-Superfamilie, Protease-Inhibitoren, Lektine, Helix-Bündel-Proteine und/oder Lipocaline.

9. Erkennungsmolekül nach Anspruch 7 oder 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Gerüstsequenzen Antikörpergerüstsequenzen sind.

10. Erkennungsmolekül nach Anspruch 8 oder 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Antikörpergerüstsequenzen für das Erkennungsmolekül nach Anspruch 1 Sequenzen der variablen schweren Kette VH und die Antikörpergerüstsequenzen für die zusätzlichen Sequenzen des Erkennungsmoleküls nach Anspruch 2 Sequenzen der variablen leichten Kette VL sind.

11. Erkennungsmolekül nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Antikörpergerüstsequenzen murinen Ursprungs sind.

5

12. Erkennungsmolekül nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Antikörpergerüstsequenzen humanen Ursprungs sind.

10 13. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Antikörpergerüstsequenzen aus Gerüstsequenzen oder Kombinationen der Gerüstsequenzen gemäß den Ansprüchen 11 oder 12 abgeleitet sind.

15 14. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 8 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Antikörpergerüstsequenzen
a) FRH1, FRH2, FRH3 und FRH4 für die variable schwere Kette VH folgende Aminosäuresequenzen sind, wobei die Aminosäureposition der Nummerierung nach Kabat entspricht:

20

für FRH1 an Position	1	Q oder E
	2	V
	3	Q, K oder T
	4	L
	5	K oder V
	6	E oder Q
	7	S
	8	G
	9	A
	10	E
	11	L oder V
	12	V oder K
	13	R oder K
	14	P
	15	G

25

30

35

16 T oder A
17 S
18 V
19 K
20 I oder V
21 S oder P
22 C
23 K
24 A, V, S oder T
25 S
26 G
27 Y, F, S oder D
28 T
29 F, L oder I
30 T
36 W
37 V
38 K oder R
39 Q
40 R oder A
41 P
42 G
43 H oder Q
44 G
45 L
46 E
47 W oder R
48 I oder M
49 G
66 K oder R
67 A oder V
68 T
69 L oder M
70 T
71 A, L oder T

5

10

15

für FRH2 an Position

20

25

30

für FRH3 an Position

35

72 D

73 T

74 S

75 S oder T

76 S

77 T

78 A

79 Y

80 M

81 Q oder E

82 L

82a S

82b S oder R

82c L

83 T oder R

84 S

85 E

86 D

87 S oder T

88 A

89 V

90 Y

91 F oder Y

92 C

93 A

94 Y, K oder R

103 W

104 G

105 Q

106 G

107 T

108 T, S oder L

109 V oder L

110 T

111 V

für FRH4 an Position

112 S

113 S oder A

b) FRL1, FRL2, FRL3 und FRL4 für die variable leichte Kette VL folgende Aminosäuresequenzen sind, wobei die Aminosäureposition der Nummerierung nach Kabat entspricht:

für FRL1 an Position	1	D
	2	I, V oder L
	3	Q oder L
	4	M
	5	T
	6	Q
	7	T oder S
	8	P
	9	L
	10	S
	11	L
	12	P
	13	V
	14	S oder T
	15	L oder P
	16	G
	17	D oder E
	18	Q oder P
	19	A
	20	S
	21	I
	22	S
	23	C
für FRL2 an Position	35	W
	36	Y
	37	L
	38	Q
	39	K
	40	P

41 G
42 Q
43 S
44 P
45 K oder Q
46 L
47 L
48 I oder V
49 Y
57 G
58 V
59 P
60 D
61 R
62 F
63 S
64 G
65 S
66 G
67 S
68 G
69 T
70 D
71 F
72 T
73 L
74 K
75 I
76 S
77 R
78 V
79 E
80 A
81 E
82 D

5

10

für FRL3 an Position

15

20

25

30

35

83 L oder V

84 G

85 V

86 Y

87 Y

88 C

für FRL4 an Position

98 F

99 G

100 G oder Q

101 G

102 T

103 K

104 L

105 E

106 I oder L

106a K

107 R

108 A

20 15. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Erkennungsmolekül eine Sequenz gemäß SEQ ID NO. 46 bis 94 umfasst.

25 16. Erkennungsmolekül nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass das Erkennungsmolekül eine Kombination der Sequenzen SEQ ID NO. 46 und 80, oder SEQ ID NO. 47 und 81, oder SEQ ID NO. 48 und 80, oder SEQ ID NO. 50 und 80, oder SEQ ID NO. 53 und 82, oder SEQ ID NO. 52 und 83, oder SEQ ID NO. 55 und 83, oder SEQ ID NO. 54 und 80, oder SEQ ID NO. 51 und 83, oder SEQ ID NO. 49 und 80, oder SEQ ID NO. 56 und 90, oder SEQ ID NO. 57 und 90, oder SEQ ID NO. 57 und 86, oder SEQ ID NO. 58 und 87, oder SEQ ID NO. 56 und 91, oder SEQ ID NO. 59 und 91, oder SEQ ID NO. 60 und 87, oder SEQ ID NO. 61 und 90, oder SEQ ID NO. 56 und 88, oder SEQ ID NO. 56 und 85, oder SEQ ID NO. 59 und 90, oder SEQ ID NO.

30

35

62 und 90, oder SEQ ID NO. 59 und 86, oder SEQ ID NO. 74 und 92, oder SEQ ID NO. 63 und 87, oder SEQ ID NO. 74 und 87, oder SEQ ID NO. 74 und 89, oder SEQ ID NO. 74 und 85, oder SEQ ID NO. 64 und 86, oder SEQ ID NO. 74 und 86, oder SEQ ID NO. 63 und 86, oder SEQ ID NO. 65 und 85, oder SEQ ID NO. 65 und 86, oder SEQ ID NO. 66 und 85, oder SEQ ID NO. 67 und 87, oder SEQ ID NO. 68 und 86, oder SEQ ID NO. 72 und 88, oder SEQ ID NO. 69 und 90, oder SEQ ID NO. 70 und 90, oder SEQ ID NO. 69 und 92, oder SEQ ID NO. 73 und 86, oder SEQ ID NO. 69 und 89, oder SEQ ID NO. 71 und 92, oder SEQ ID NO. 56 und 86, oder SEQ ID NO. 65 und 92 umfasst.

17. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 16, **dadurch gekennzeichnet**, dass die variable schwere Kette VH und die variable leichte Kette VL auf verschiedenen Polypeptidketten liegen.

18. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 16, **dadurch gekennzeichnet**, dass die variable schwere Kette VH und die variable leichte Kette VL miteinander in einem Fusionsprotein direkt verbunden sind.

19. Erkennungsmolekül nach Anspruch 18, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Ketten in dem Fusionsprotein über einen Linker verbunden sind.

20. Erkennungsmolekül nach Anspruch 19, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Linker aus 1 bis 9 Aminosäuren besteht.

21. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 20, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Erkennungsmolekül zusätzliche His-Tag, myc-Tag, Lysin-reiche Sequenzen und/oder Multimerisierungssequenzen umfasst.

22. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass es von einem Immunglobulin abgeleitet ist.
- 5 23. Erkennungsmolekül nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass es ein single chain Antikörperfragment, ein Multibody, ein Fab-Fragment, ein Fusionsprotein aus einem Antikörperfragment mit Peptiden oder Proteinen und/oder ein Immunglobulin der Isotypen IgG, IgM, IgA, IgE, IgD und/oder deren Subklassen ist.
- 10 24. Erkennungsmolekül nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass es ein muriner, chimärisierter, humanisierter, humaner, partiell humaner Antikörper oder Antikörperfragment ist.
- 15 25. Erkennungsmolekül nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass es ein IgM ohne J Kette ist.
- 20 26. Erkennungsmolekül nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Sequenz gemäß SEQ ID NO. 95 bis 113 umfasst.
- 25 27. Konstrukt umfassend die Erkennungsmoleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Erkennungsmoleküle mit Zusatzsequenzen und/oder Strukturen fusioniert, chemisch gekoppelt oder nicht-kovalent assoziiert sind.
- 30 28. Konstrukt nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass die Erkennungsmoleküle mit (i) Immunglobulindomänen verschiedener Spezies, (ii) Enzymmolekülen, (iii) Interaktionsdomänen, (iv) Domänen zur Stabilisierung, (v) Signalsequenzen, (vi) Fluoreszenzfarbstoffen, (vii) Toxinen, (viii) katalytischen Antikörpern, (ix) einem oder mehreren Antikörpern oder Antikörperfragmenten mit anderer
- 35

Spezifität, (x) zytolytischen Komponenten, (xi) Immunmodulatoren, (xii) Immuneffektoren, (xiii) MHC-Klasse I oder Klasse II Antigenen, (xiv) Chelatoren zur radioaktiven Markierung, (xv) Radioisotopen, (xvi) Liposomen, (xvii) Transmembrandomänen, (xviii) Viren und/oder (xix) Zellen fusioniert, chemisch gekoppelt, kovalent oder nicht-kovalent assoziiert sind.

29. Konstrukt nach Anspruch 28, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Zellen Makrophagen sind.

30. Isoliertes Nukleinsäuremolekül umfassend Nukleinsäuresequenzen, die die Aminosäuresequenz von mindestens einem Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 26 oder ein Konstrukt nach einem der Ansprüche 27 bis 29 kodiert.

31. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 30, **dadurch gekennzeichnet, dass** es eine genomische DNA, eine cDNA und/oder eine RNA ist.

32. Expressionskassette oder Vektor umfassend ein Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 30 oder 31 und einen Promotor, der operativ mit der Nukleinsäure verknüpft ist.

33. Virus umfassend mindestens einen Vektor oder eine Expressionskassette nach Anspruch 32.

34. Wirtszelle umfassend mindestens einen Vektor oder eine Expressionskassette nach Anspruch 32.

35. Wirtszelle nach Anspruch 34, **dadurch gekennzeichnet, dass** sie eine prokaryontische oder eukaryontische Zelle ist.

36. Wirtszelle nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Bakterien-, Hefe-, Pflanzen-, Insekten- und/oder Säugerzelle ist.
- 5 37. Wirtszelle nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, dass die Säugerzelle eine Hamster-, Maus- und/oder humane Zelle ist.
- 10 38. Wirtszelle nach einem der Ansprüche 34 bis 37, dadurch gekennzeichnet, dass die Wirtszelle E. coli, S. cerevisiae, P. pastoris, D. melanogaster, CHO-K1, CHOdhfr-, NS0, SP2/0, HEK 293, COS-1, COS-7, Percy 6, Namalwa oder K562 ist.
- 15 39. Wirtszelle nach Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, dass die Wirtszelle eine Effektorzelle ist.
40. Organismus umfassend mindestens eine Wirtszelle nach einem der Ansprüche 34 bis 38.
- 20 41. Organismus nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, dass der Organismus ein pflanzlicher oder tierischer transgener Organismus ist.
- 25 42. Zusammensetzung umfassend
- (i) mindestens ein Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 26,
 - (ii) mindestens ein Konstrukt nach einem der Ansprüche 27 bis 29 und/oder
 - (iii) mindestens ein Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 30 oder 31.
- 30
- 35 43. Zusammensetzung nach Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung eine pharmazeutische Zusammensetzung, gegebenenfalls mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger, ist.

44. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 42 oder 43, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Erkennungsmolekül:

- (i) ein radioaktiv-markiertes Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 26 und/oder
- (ii) ein nicht-markiertes Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 26 umfasst.

45. Zusammensetzung nach Anspruch 44, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Erkennungsmolekül ein Erkennungsmolekül nach Anspruch 26 umfasst.

46. Zusammensetzung nach Anspruch 42, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Zusammensetzung eine Vakzinen-Zusammensetzung ist.

47. Verfahren zur Herstellung von Erkennungsmolekülen nach einem der Ansprüche 1 bis 28 umfassend

- (i) Einbringen eines oder mehrerer Nukleinsäuremoleküle nach einem der Ansprüche 30 oder 31 und/oder einer Expressionskassette oder eines Vektors nach Anspruch 32 in ein Virus nach Anspruch 33 oder in eine Wirtszelle nach einem der Ansprüche 34 bis 39;
- (ii) Kultivierung der Wirtszellen oder des Virus unter geeigneten Bedingungen; und
- (iii) Gewinnung des Erkennungsmoleküls, der Erkennungsmolekül tragenden Effektorzelle oder des Virus, das ein Core-1 Antigen spezifisch erkennt.

48. Verfahren zur Herstellung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 42 bis 46, umfassend eine Kombination eines Erkennungsmoleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 26, eines Konstruktes nach einem der Ansprüche 27 bis 29, einer Nukleinsäure nach Anspruch 30 oder 31 und/oder einem Vektor nach Anspruch 32 mit einem pharmazeutisch geeigneten Träger, einer Lösung und/oder einem Adjuvans.

49. Verfahren nach Anspruch 48, weiterhin umfassend den Schritt der Formulierung der Zusammensetzung in pharmazeutisch verträglicher und/oder wirksamer Form.

5
10
15
50. Verwendung eines Erkennungsmoleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 26, eines Konstruktes nach einem der Ansprüche 27 bis 29, eines Nukleinsäuremoleküls nach Anspruch 30 oder 31, eines Vektors nach Anspruch 32, eines Virus nach Anspruch 33, einer Wirtszelle nach einem der Ansprüche 34 bis 39, eines Organismus nach Anspruch 40 oder 41 und/oder einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 42 bis 46 zur Prophylaxe, Prävention, Diagnose, Verminderung, Therapie, Verlaufskontrolle und/oder Nachbehandlung von Tumorerkrankungen und/oder Metastasen.

20
51. Verwendung nach Anspruch 50 zur Prophylaxe, Prävention, Diagnose, Verminderung, Therapie, Verlaufskontrolle und/oder Nachbehandlung von Core-1 positiven Tumorerkrankungen und/oder Metastasen.

25
52. Verwendung nach Anspruch 50 oder 51 zur Prophylaxe, Prävention, Diagnose, Verminderung, Therapie, Verlaufskontrolle und/oder Nachbehandlung von Karzinomen.

30
53. Verwendung nach Anspruch 52 zur Prophylaxe, Prävention, Diagnose, Verminderung, Therapie, Verlaufskontrolle und/oder Nachbehandlung von Mammakarzinomen, Gastrointestinaltumoren, einschließlich Kolonkarzinomen, Magenkarzinomen, Pankreaskarzinomen, Dickdarmkrebs, Dünndarmkrebs, Ovarialkarzinomen, Zervikalkarzinomen, Lungenkrebs, Prostatakrebs, Nierenzellkarzinomen und/oder Lebermetastasen.

54. Verwendung nach einem der Ansprüche 50 bis 53 zur Prophylaxe, Prävention, Diagnose, Verminderung, Therapie, Verlaufskontrolle und/oder Nachbehandlung der Metastasierung.

5

55. Verwendung nach Anspruch 54, wobei das Erkennungsmolekül ein nicht markiertes Erkennungsmolekül nach Anspruch 26 ist, das einem IgM oder IgG entspricht oder davon abgeleitet wurde.

10

56. Verwendung nach einem der Ansprüche 50 bis 55, wobei das Erkennungsmolekül ein radioaktiv-markiertes Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 26 ist oder eines Konstruktes nach einem der Ansprüche 27 bis 29.

15

57. Verwendung nach Anspruch 56, wobei die Erkennungsmoleküle Multibodies sind.

20

58. Verwendung nach Anspruch 56, wobei das Erkennungsmolekül ein Erkennungsmolekül nach Anspruch 26 ist.

25

59. Verwendung nach einem der Ansprüche 50 bis 58, wobei das Erkennungsmolekül ein nicht markiertes Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 26 oder eines Konstruktes nach einem der Ansprüche 27 bis 29 und ein markiertes Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 26 oder eines Konstruktes nach einem der Ansprüche 27 bis 29 ist, wobei beide Erkennungsmoleküle oder Konstrukte kombiniert sind.

30

60. Verwendung nach Anspruch 59, wobei das nicht markierte Erkennungsmolekül ein Erkennungsmolekül nach Anspruch 26 ist.

61. Verwendung nach Anspruch 59, wobei das markierte Erkennungsmolekül ein Erkennungsmolekül nach Anspruch 26 ist.

5 62. Verfahren zur Herstellung eines Diagnostikums umfassend die Schritte des Anspruchs 47 zur Herstellung von Core-1 spezifischen Erkennungsmolekülen und umfassend den Schritt der Formulierung der Erkennungsmoleküle in einer diagnostisch geeigneten Form.

10 63. Verfahren nach Anspruch 62, dadurch gekennzeichnet, dass die Erkennungsmoleküle biotinyliert, fluoreszenz- markiert, radioaktiv markiert, durch Enzymkopplung direkt markiert sind und/oder über einen sekundären entsprechend markierten Antikörper nachgewiesen werden.

15 64. Verwendung von einem der Verfahren nach Anspruch 62 oder 63, wobei das Erkennungsmolekül zur Diagnose von Tumorerkrankungen und/oder Metastasen, zur Prognose von Tumorerkrankungen und/oder zur Verlaufskontrolle von
20 Tumorerkrankungen eingesetzt wird.

65. Verwendung nach Anspruch 64, wobei die Tumorerkrankungen und/oder Metastasen die Leber betreffen.

25 66. Verwendung nach Anspruch 64 und/oder des Verfahrens nach Anspruch 63 oder 64 zur Diagnose für das Antigen Core-1 tragende Tumoren.

30 67. Verwendung nach Anspruch 66, wobei die Tumore Mammakarzinome, Gastrointestinaltumore, einschließlich Kolonkarzinome, Magenkarzinome, Pankreaskarzinome, Dickdarmkrebs, Dünndarmkrebs, Ovarialkarzinome, Zervikalkarzinome, Lungenkrebs, Prostatakrebs, Nierenzellkarzinome und/oder Lebermetastasen sind.

68. Verwendung von einem der Verfahren nach Anspruch 62 oder 63, wobei die Erkennungsmoleküle in einem Gewebsschnelltest zum immunhistologischen Nachweis eingesetzt werden.

5 69. Verwendung nach einem der Ansprüche 64 bis 67, wobei die Erkennungsmoleküle in einem Gewebsschnelltest zum immunhistologischen Nachweis eingesetzt werden.

10 70. Verwendung nach einem der Ansprüche 64 bis 69, wobei die Erkennungsmoleküle in einem serologischen Test im Sandwich-Verfahren eingesetzt werden.

15 71. Verwendung nach einem der Ansprüche 64 bis 70, wobei die Erkennungsmoleküle in einer in vivo Diagnostik in Form einer Radioimmundiagnostik, PET-Scan Verfahren und/oder Immunfluoreszenzendoskopie eingesetzt werden.

20 72. Verwendung nach einem der Ansprüche 64 bis 71, weiterhin umfassend mindestens einen weiteren Antikörper gegen mindestens ein weiteres Tumorantigen und/oder gegen mindestens ein Trägermolekül des Core-1 Antigens.

25 73. Kit umfassend ein Erkennungsmolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 26 und/oder ein Konstrukt gemäß einem der Ansprüche 27 bis 29.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Erkennungsmoleküle, die gegen Tumore gerichtet sind und zur Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen verwendet werden können.

[illegible]

Abb. 1b

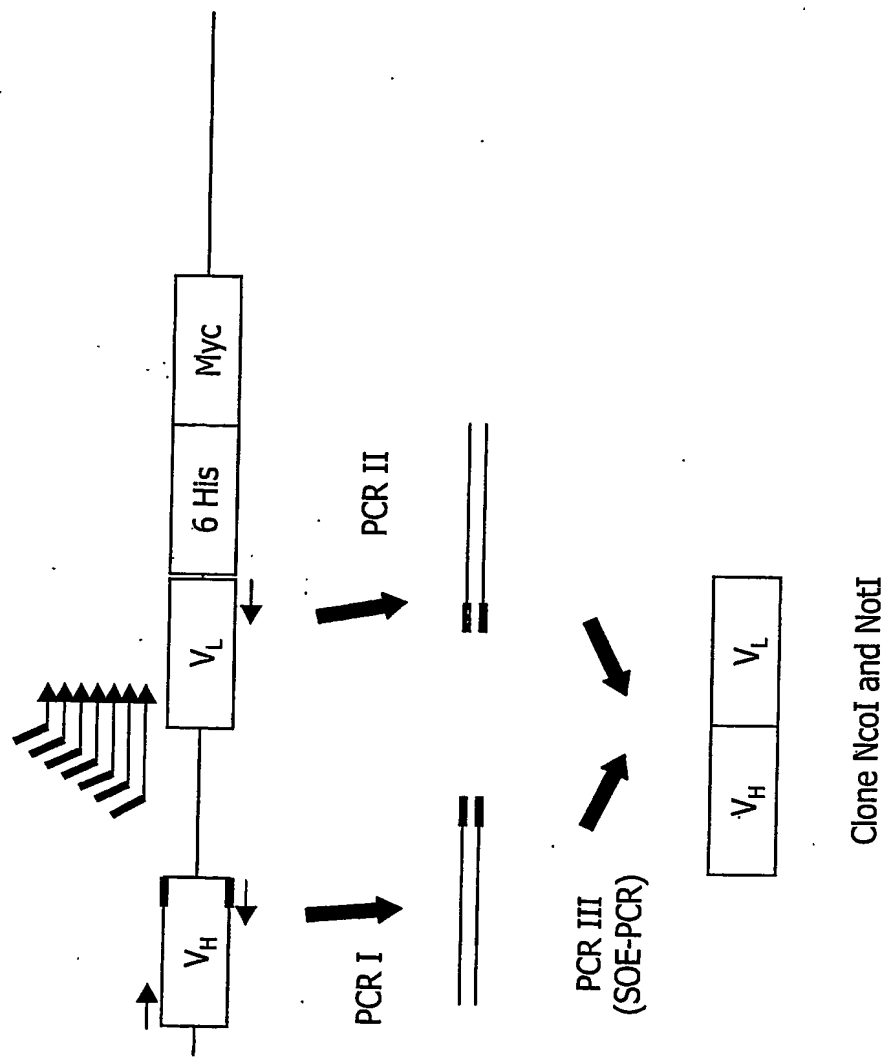


Abb. 2

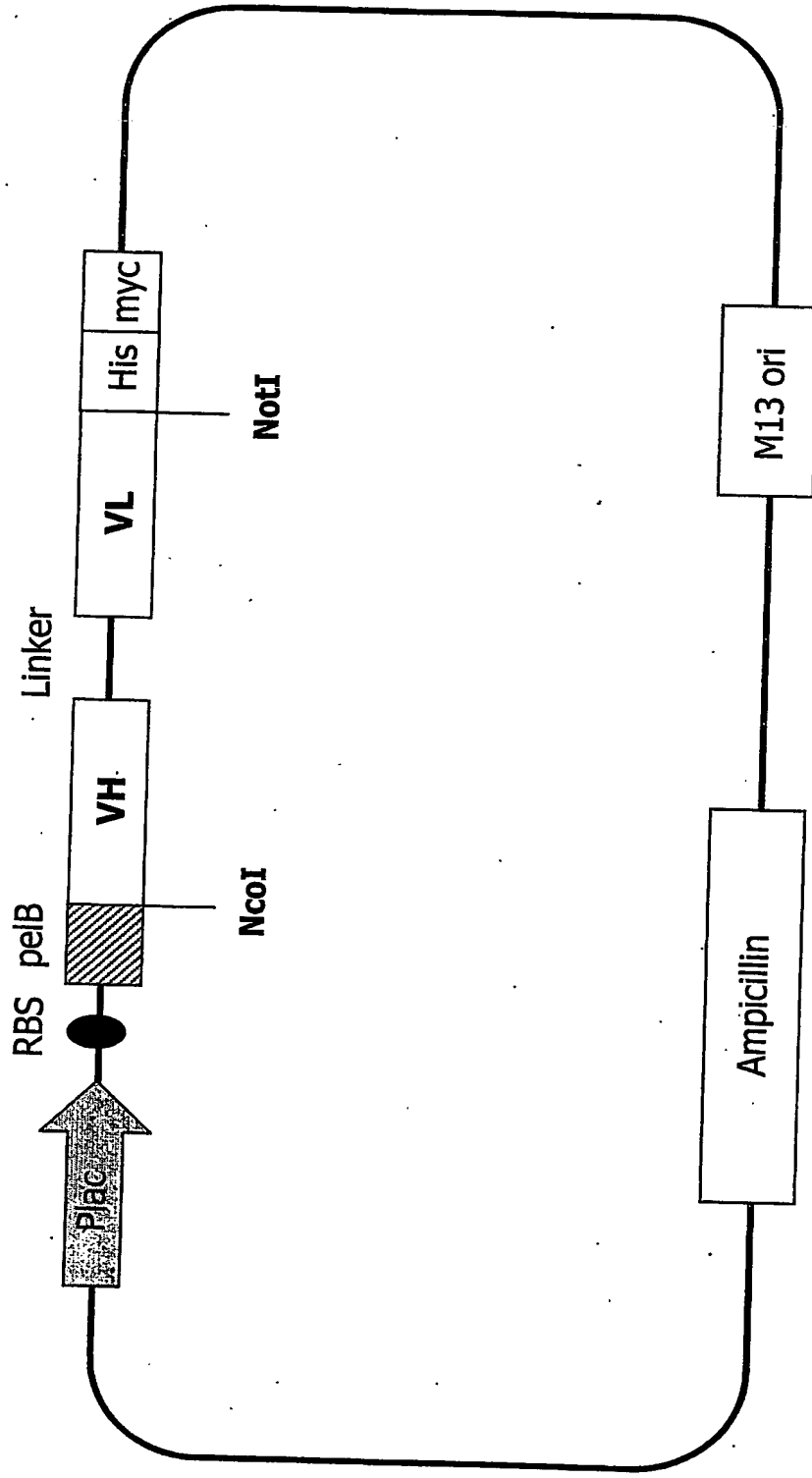
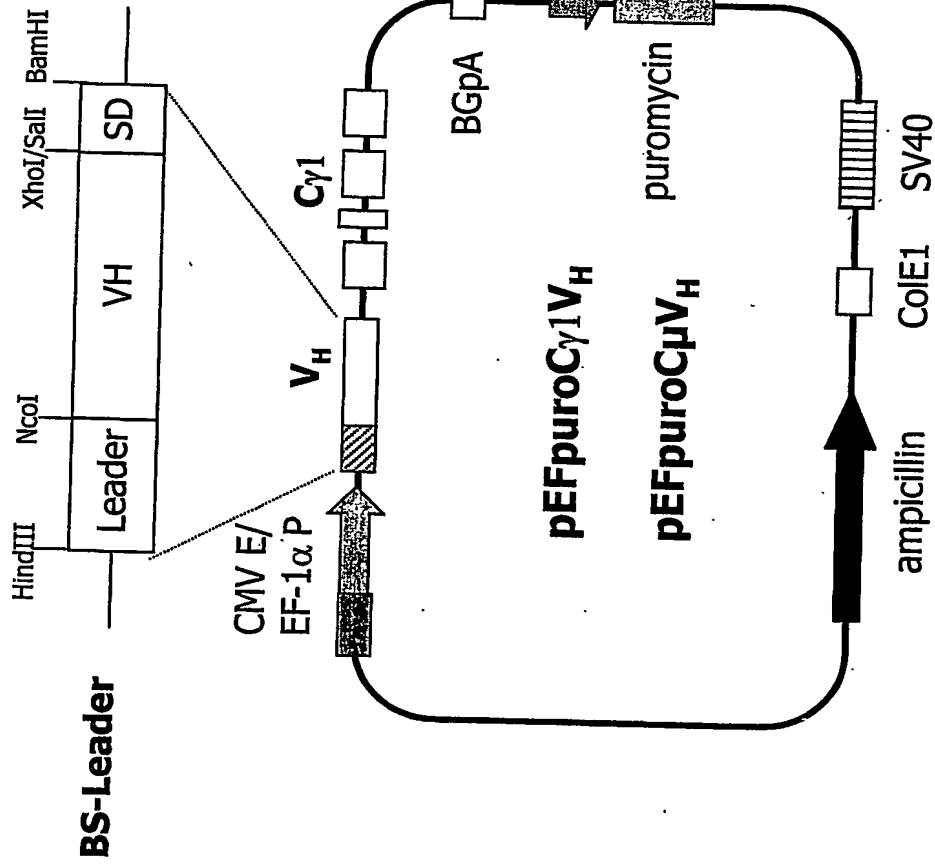


Abb. 4



Cy1 constant region

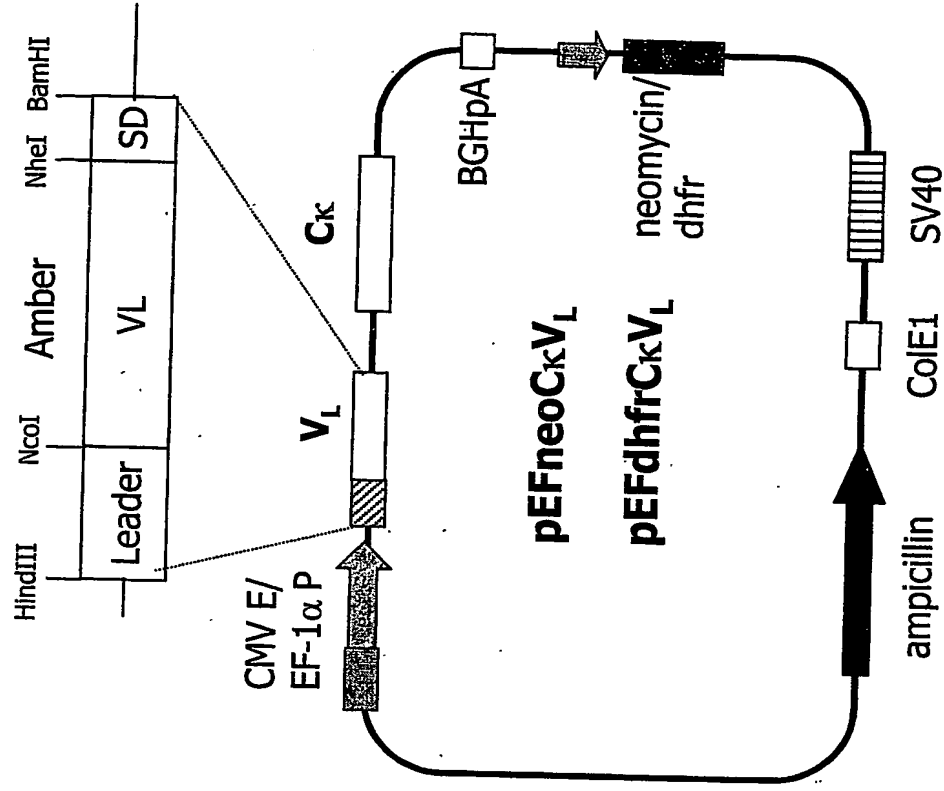
FOR: 5'-AATT GGATCC GAGCCAGACACTGGAC-3'

REV: 5'-ACCG TCTAGA CGCACTCATTACCGG-3'

Cy constant region

FOR: 5'-ATCGGATCC GATAGCCATGACAGTCTG-3'

REV: 5'-AGC GTC TAG ACA GGG TCA GTA GCA GG-3'

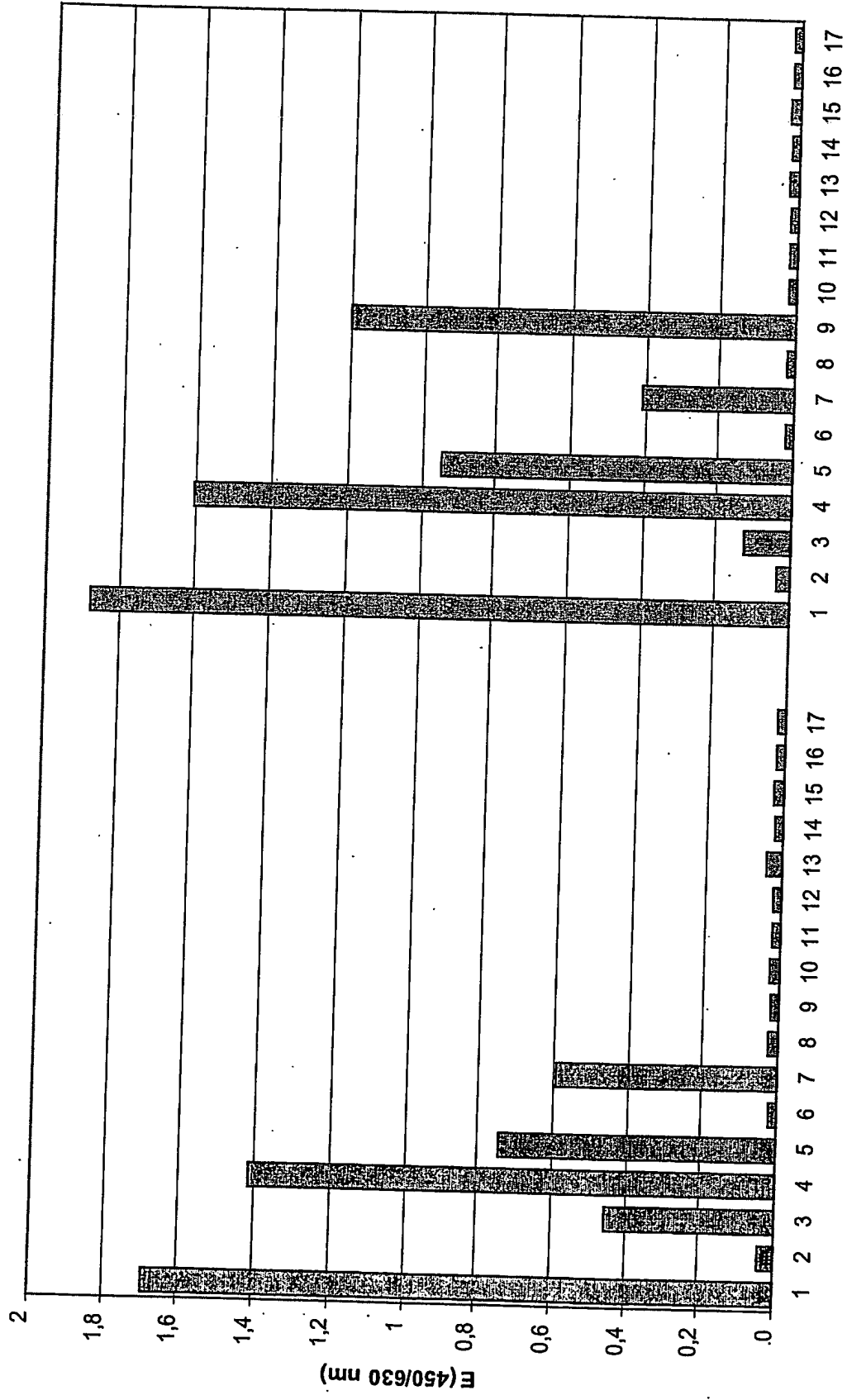


Kappa constant region

FOR: 5'-ACCT GGATCC GCTAGGAAGAACTCAAAAC-3'

REV: 5'-ACCG TCTAGA CCCTCTAACACTCTCCCTG-3'

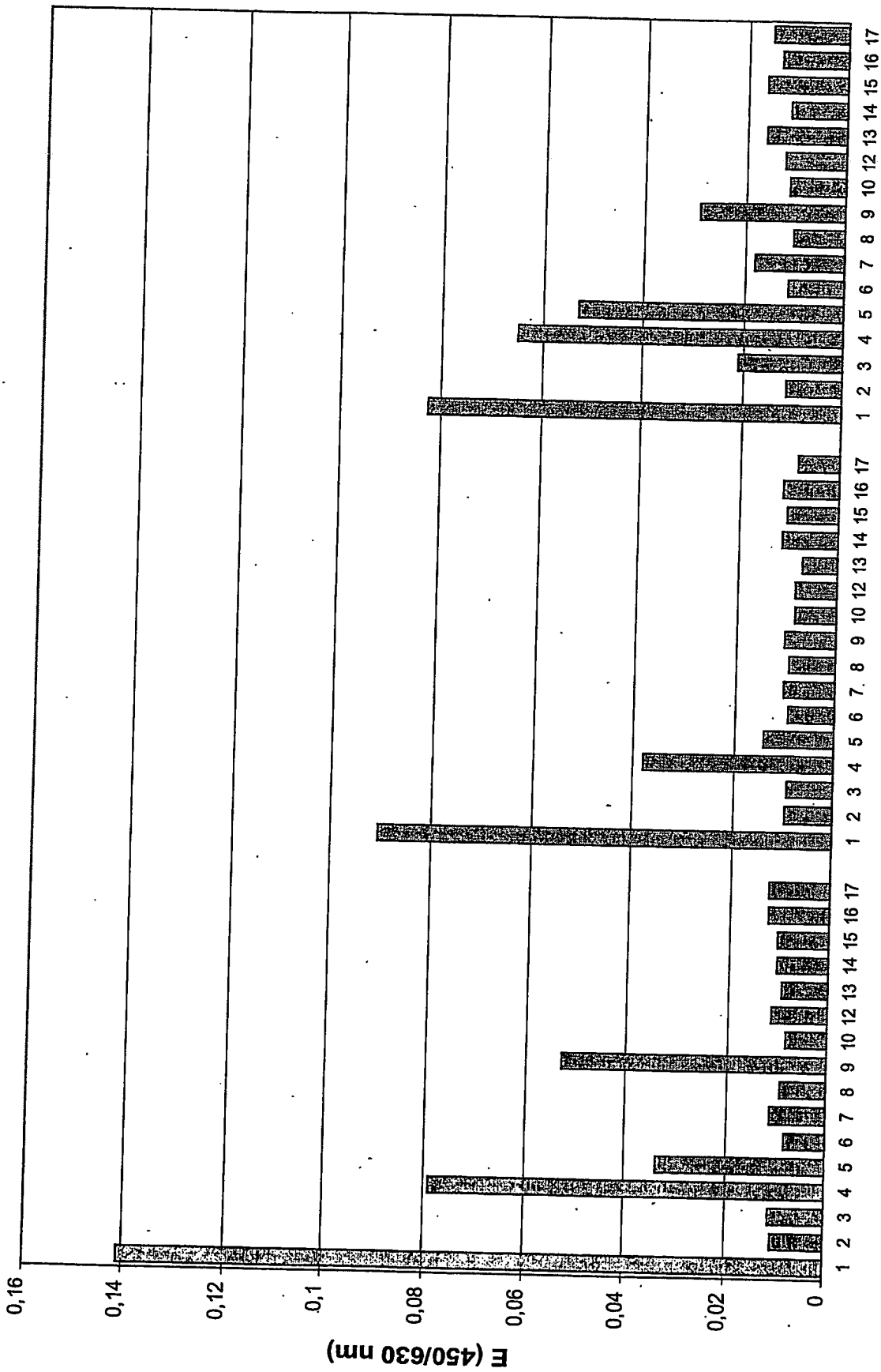
Abb. 5



mlgM-Karo2

mlgM-Karo4

Abb. 6



Karo21

Karo38

Karo11

Abb. 7a

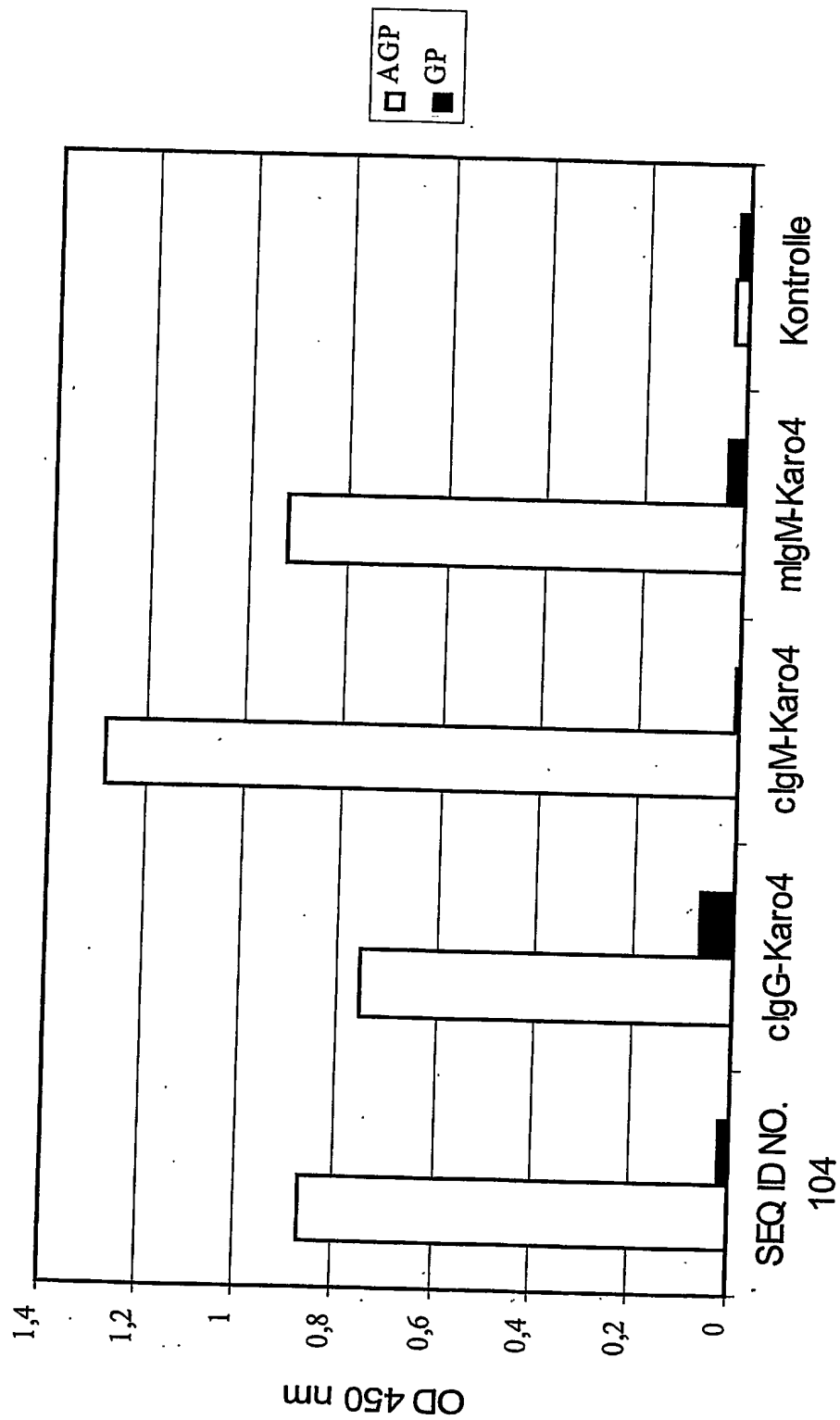


Abb. 7b

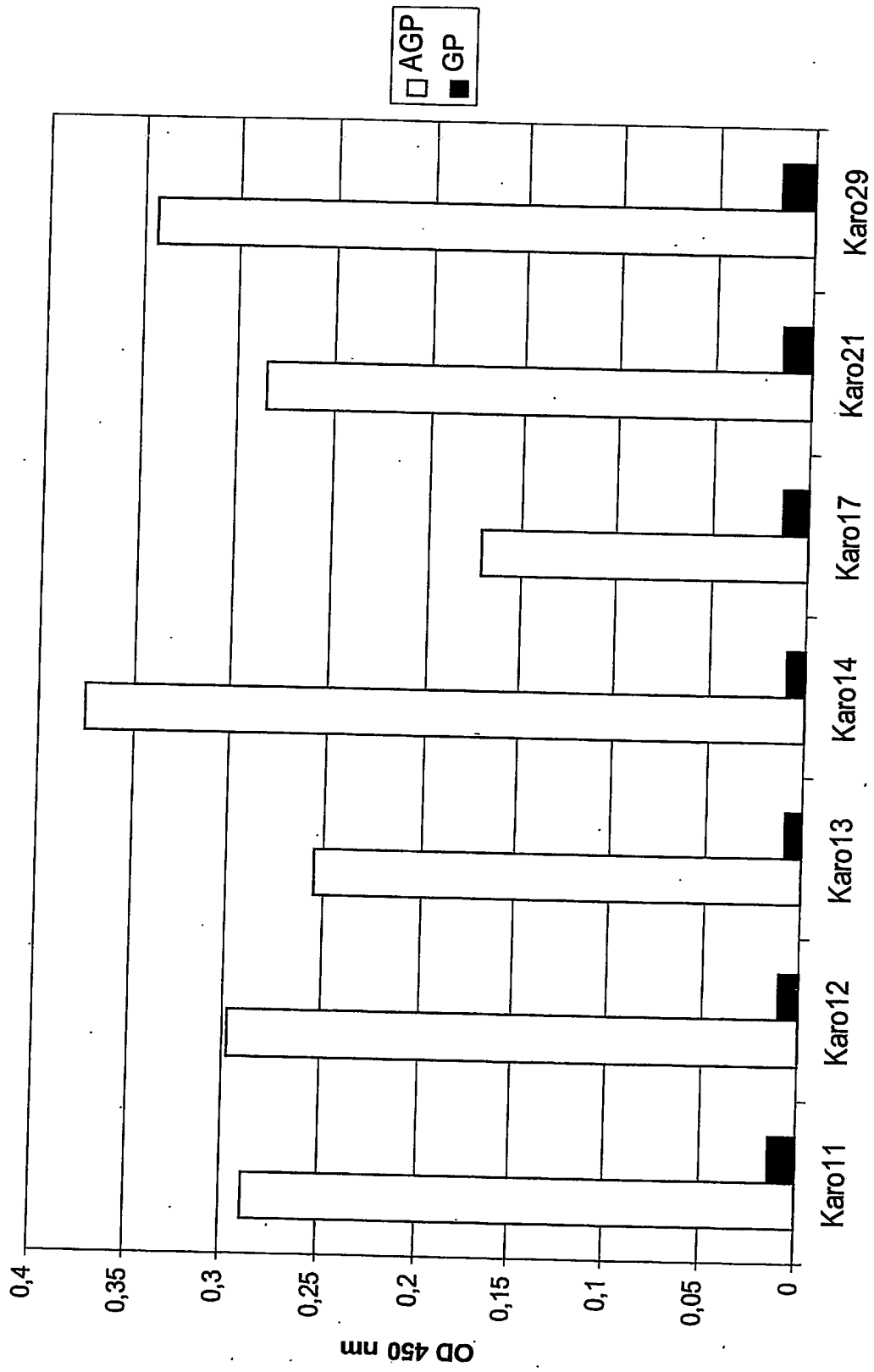


Abb. 7c

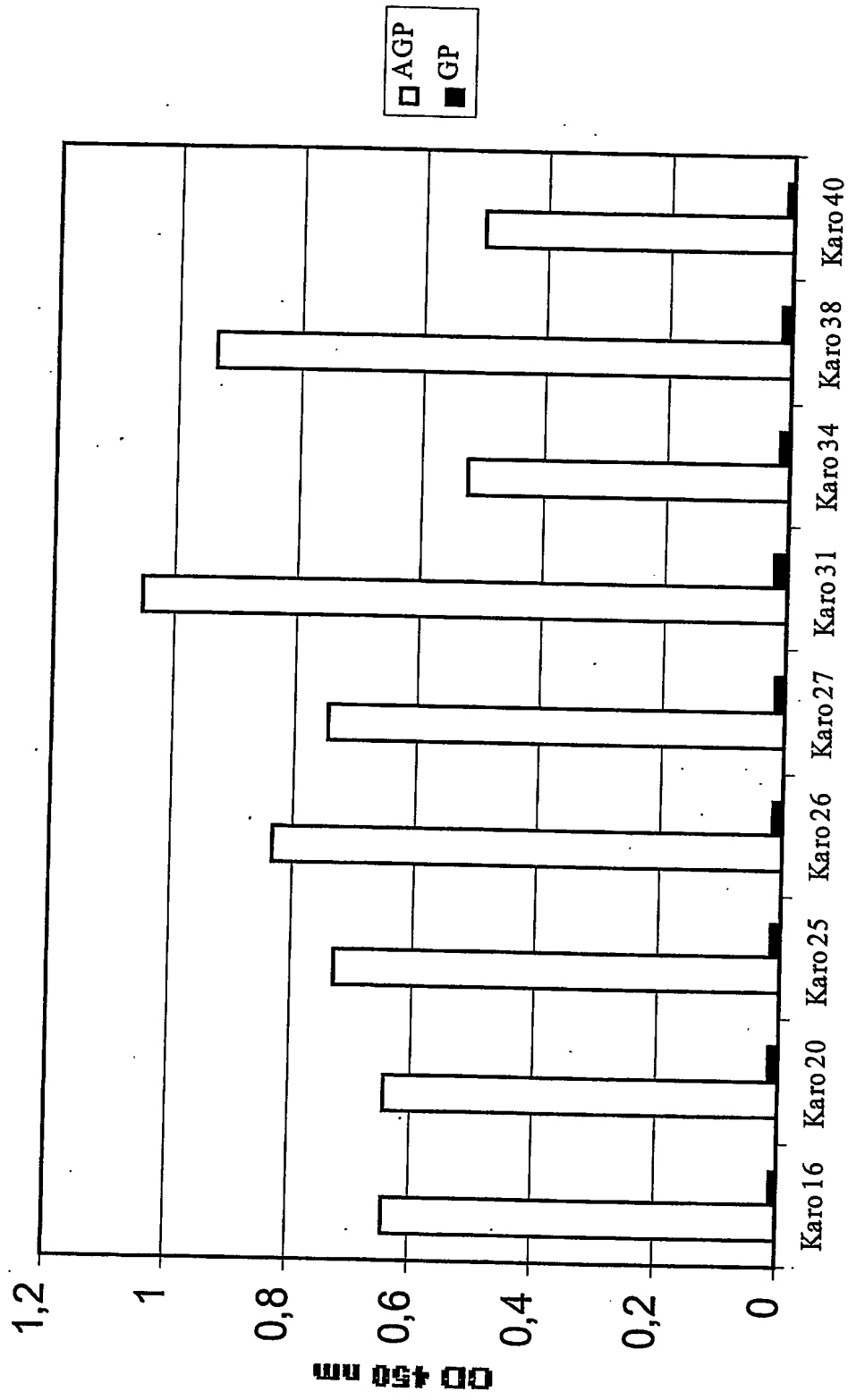


Abb. 7d

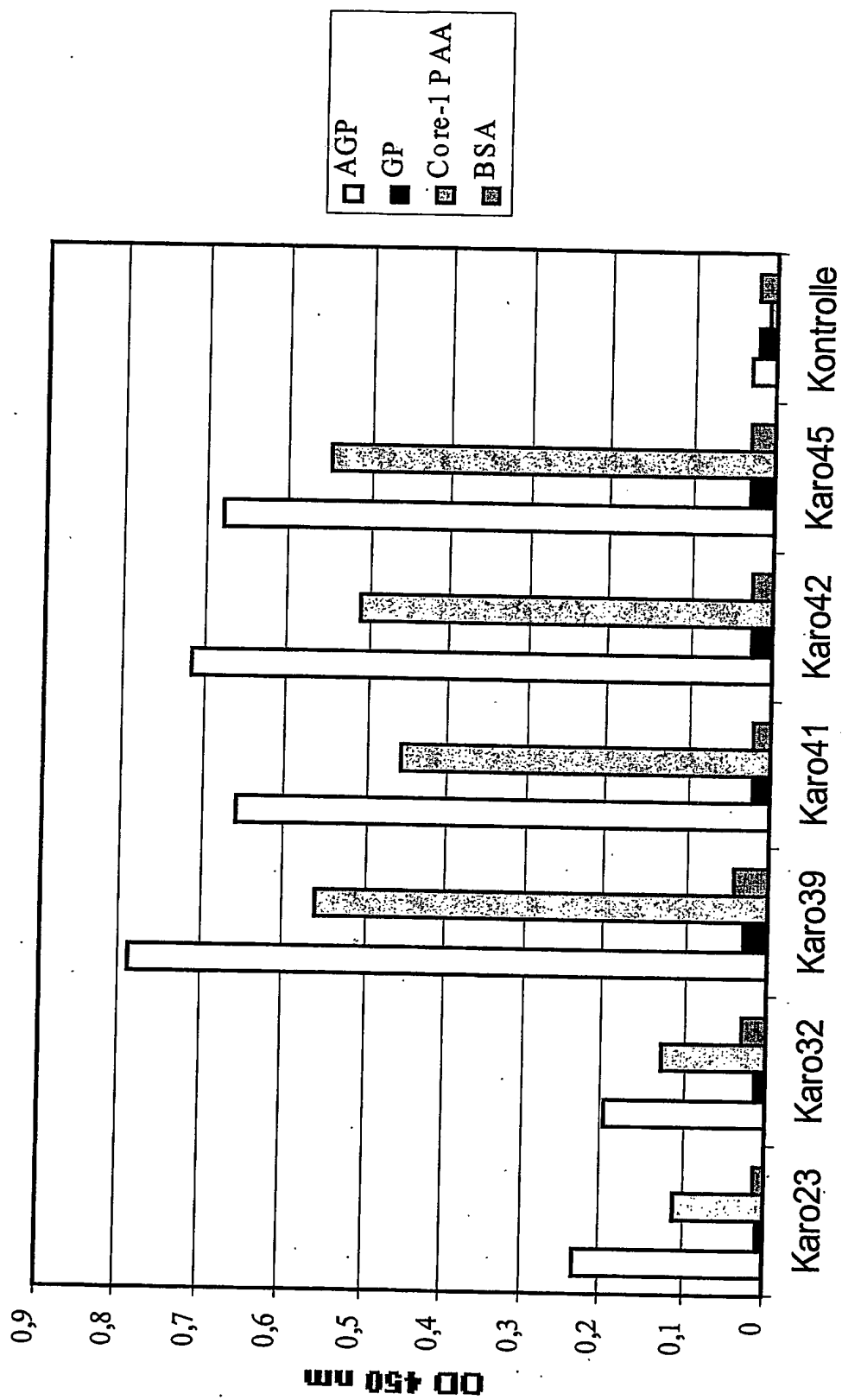


Abb. 7e

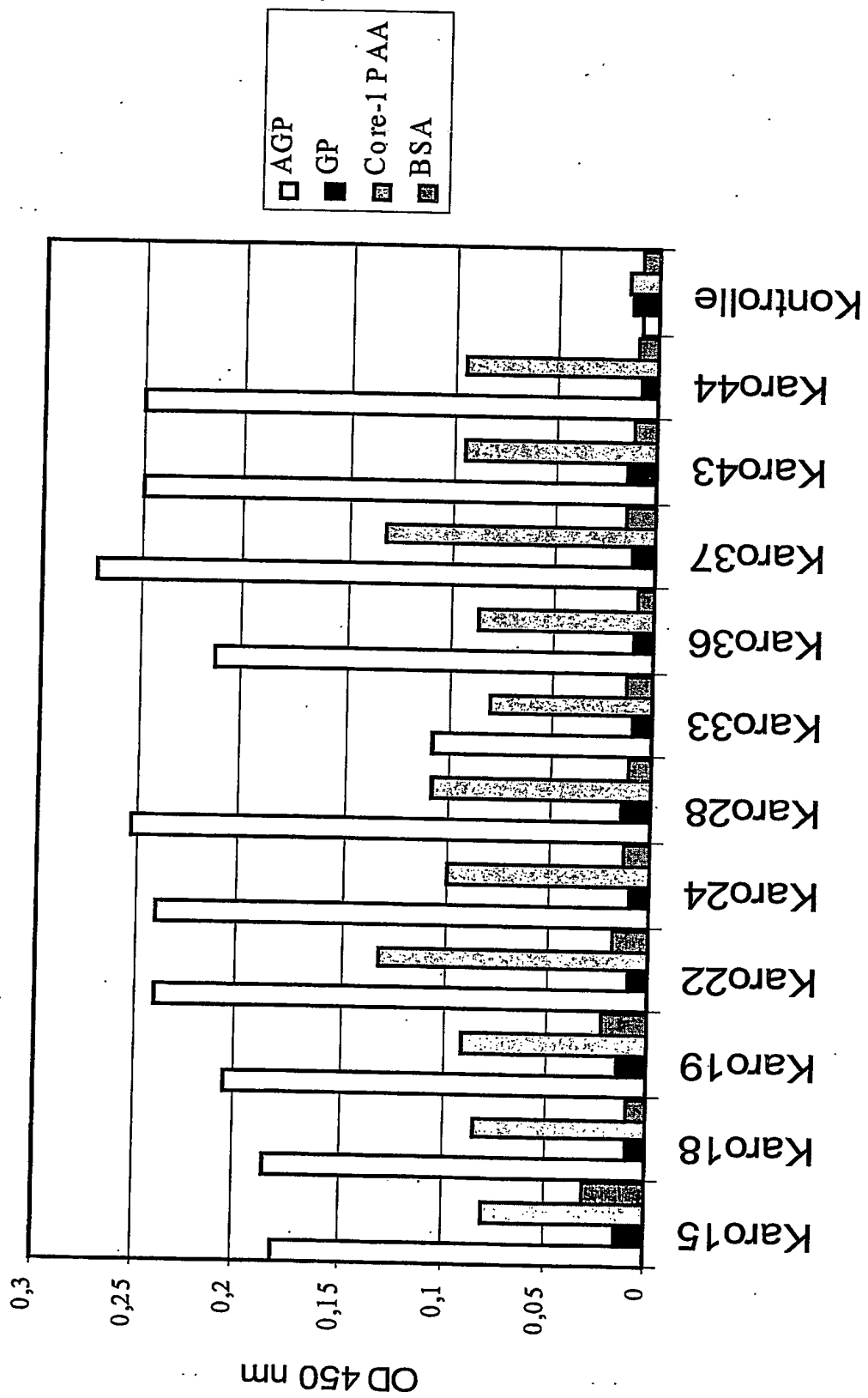
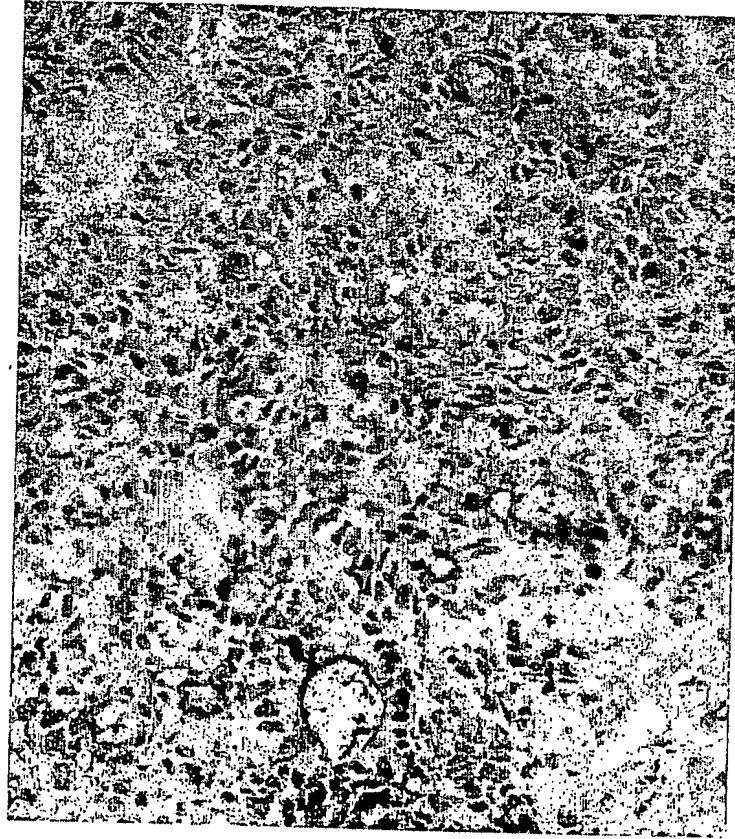


Abb. 8

Färbung mit cIgG-Karo4



Negativkontrolle

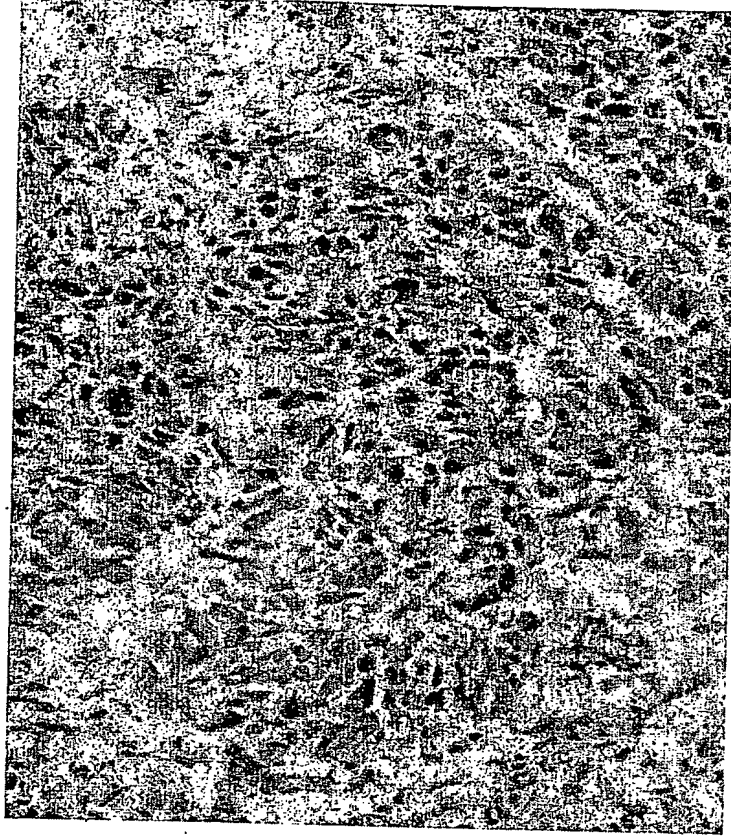
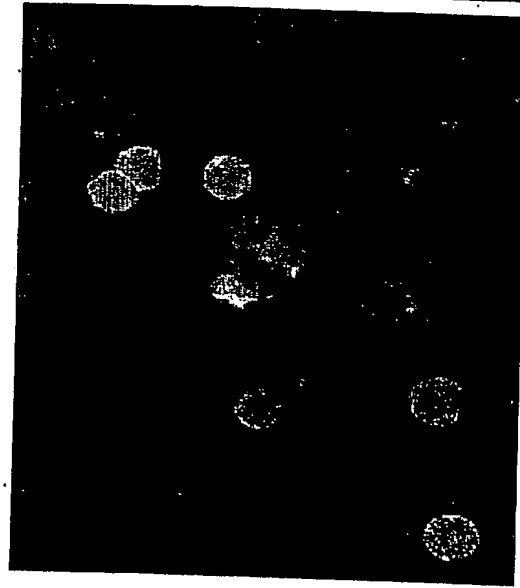
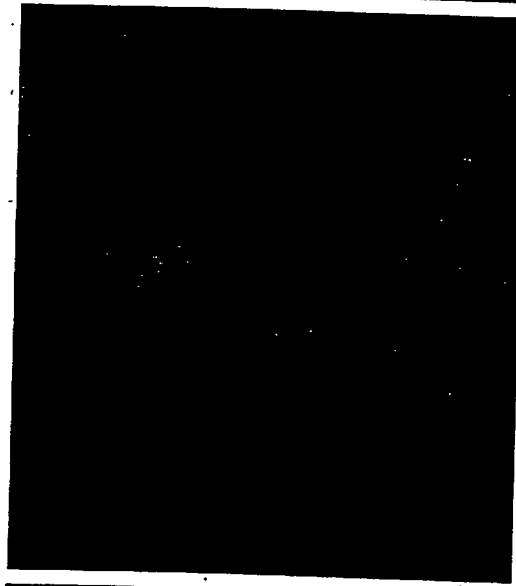


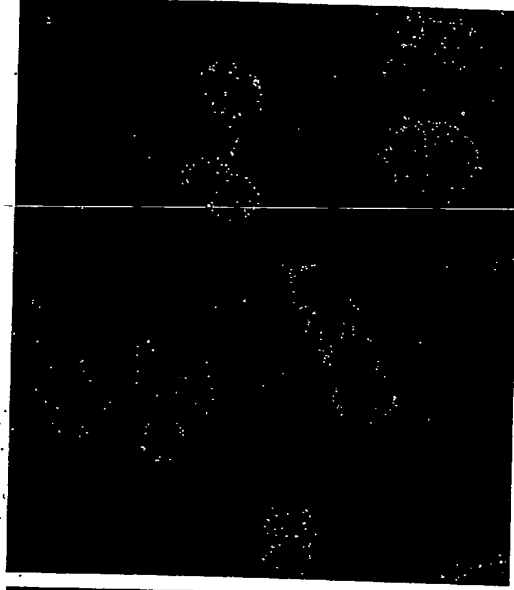
Abb. 9



mIgM-Karo4



SEQ ID Nr. 95



SEQ ID Nr. 104

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKewed/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.